ORSAY
Série A. N°
N° D'ordre
504

Sujet de la Thèse

HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PIGMENTS LIPOSOLUBLES DES CHLOROPLASTES DE BLÉ

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles

enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro 3297

Madame Marie - Esther DEROCHE née LABORIE

Soutenue le 30 Mai 1969

à la FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY

devant le Jury

M. MOYSE , Président

MM. BOURDU , COSTES et LAVOREL , examinateurs .

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Physiol. Vég., 1969, **7** (4), 335-389.

Hétérogénéité des pigments liposolubles des chloroplastes de Blé

Marie-Esther DEROCHE

Laboratoire de Chimie Biologique,
Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 78-Grignon.

(Manuscrit reçu le 19 mai 1969)

RÉSUMÉ

L'hétérogénéité des pigments chloroplastiques a été étudiée par la technique d'extraction ménagée, améliorée par son emploi sur des organites lyophilisés ; divers facteurs l'influencent : nature et volume des solvants, température, teneur en eau du matériel végétal. Quelques précisions sur le traitement des pigments sont apportées : dosage des chlorophylles en mélange dans des proportions inhabituelles, séparation quantitative des pigments en carotènes, xanthophylles et chlorophylles, limites de l'extinction pendant les comptages de radioactivité.

Tous les pigments liposolubles sont hétérogènes dans leurs forces de liaison aux chloroplastes et dans leurs vitesses de renouvellement. Le β-carotène a au moins 2 fractions métaboliques ; l'enthalpie de liaison par site molaire d'association est calculée d'après l'influence de la température. Les xanthophylles présentent au moins 3 fractions métaboliques. Les chlorophylles des limbes verts se subdivisent en au moins 3 formes : (I) = 5 %, facile à extraire, très marquée par ^{14}C et ^{3}H, (II) = 80-90 %, moyennement liée, très peu marquée, (III) = 5-10 %, très liée, marquée par ^{3}H. Les limbes étiolés qui verdissent donnent des résultats intéressants, mais difficiles à interpréter.

La fraction de chlorophylle *a* néoformée est mieux sélectionnée par l'emploi de l'éther de pétrole seul sur du matériel lyophilisé. On peut formuler des hypothèses sur la signification physiologique des divers compartiments décrits.

SUMMARY

The heterogeneity of chloroplast pigments was studied by mild extraction improved when used on freeze-dried organites ; the nature and the volume of solvents, the temperature, the water content of plant were important factors. Some points on pigment treatment were specified : analysis of chlorophyll a *and* b *with unusual* a/b *ratios, quantitative separation of carotenes, xanthophylls and chlorophylls, limits of quenching in radioactivity counting.*

Ce travail constitue l'article principal d'une Thèse de Doctorat d'Etat (Sc. Nat.) présentée à la Faculté des Sciences d'Orsay, en 1969 et qui porte le N° 3297 à l'enregistrement du Centre National de la Recherche Scientifique.

UNIV. LEIDEN BIBL.

All the carotenoids and chlorophylls were shown heterogeneous in their binding forces to plastid structures and in their turnover. At least 2 metabolic fractions of β-carotene were described ; it was possible to estimate the molar binding enthalpy of this pigment bulk. Xanthophylls were divided in at least 3 metabolic fractions. In green leaves, there are 3 forms of chlorophylls : (I) = 5 %, *easily extractible, strongly labelled with* ^{14}C *and* ^{3}H, (II) = 80-90 %, *fairly bound, not very labelled,* (III) = 5-10 %, *very bound, labelled by* ^{3}H. *The interesting results obtained with greening etiolated leaves were difficult to interpret.*

The newly synthesized chlorophyll a form was more selected by use of only petroleum ether on freeze-dried material. The physiological role of different pigment compartments was assumed.

« C'est un grand agrément que la diversité.
Nous sommes bien comme nous sommes.
Donnez le même esprit aux hommes
Vous ôtez tout le sel de la société.
L'ennui naquit un jour de l'uniformité. »
La MOTTE-HOUDAR (1672-1731)
Fabl., les amis trop d'accord.

I. INTRODUCTION

La biologie fournit à l'observation d'innombrables combinaisons d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et de quelques autres éléments ; leur diversité est bien aussi grande que celle des caractères humains dont se réjouit LA MOTTE-HOUDAR. Depuis un siècle et demi, de nombreux chercheurs ont analysé ces composés ; ils ont décrit les propriétés chimiques et physiques qui servent à les caractériser ; finalement on s'aperçoit qu'une substance chimiquement bien définie présente une hétérogénéité fine due à l'environnement dans lequel elle se trouve.

La notion d'hétérogénéité

Dans les organes visibles comme dans ceux qui sont microscopiques, on peut décrire une diversité des structures et des fonctions. Les plantes qui croissent dans un champ sont variées ; les feuilles d'un végétal supérieur n'ont pas le même âge, et, en conséquence elles n'ont pas les mêmes propriétés, par exemple la même activité photosynthétique. De plus, dans une feuille de *Bryophyllum,* diverses zones peuvent être délimitées (BOURDU *et al.,* 1965 *a* et *b,* RÉMY et CHAMPIGNY, 1966) dans lesquelles la croissance, la structure et les fonctions des chloroplastes varient. De même, on sait que la partie basale d'un limbe de Graminée est plus jeune que la zone distale. Dans une cellule de *Nitella,* GIBOR (1967) a photographié des chloroplastes qui n'ont pas encore tout l'équipement enzymatique permettant la synthèse de l'amidon, parmi d'autres organites ayant incorporé activement un précurseur radioactif.

Au milieu des nombreux engrenages aptes à mener à son terme la photosynthèse dans un chloroplaste, les molécules de chlorophylles, pièges principaux et efficaces de l'énergie lumineuse, sont, elles aussi, hétérogènes. Nous avons passé en revue les techniques qui ont permis de décrire des formes pigmentaires

(DEROCHE et COSTES, 1966 *a*). La région d'absorption de la lumière rouge par la chlorophylle des feuilles, des algues ou des fragments de chloroplastes, se résout en un maximum principal et de nombreux épaulements. La réémission de lumière par les mêmes organites dans la zone rouge ou proche infrarouge se fait en plusieurs bandes encore mieux séparées. Ainsi apparaissent trois ou quatre classes de chlorophylle *a in vivo*. D'autre part, les résultats fournis par le dichroïsme, la polarisation de fluorescence, la résonance paramagnétique électronique montrent qu'une partie de la chlorophylle est anisotrope dans les structures chloroplastiques. La centrifugation différentielle de chloroplastes préalablement traités par les ultrasons, par des variations de températures ou par des détergents, permet l'isolement de complexes lipoprotéines-pigments dont on a étudié les propriétés spectrales, la composition et les aptitudes fonctionnelles. Depuis notre mise au point de 1966, de nombreux articles ont paru sur ce sujet.

La séparation des réactions primaires de la photosynthèse entre deux photosystèmes a drainé l'intérêt de nombreux chercheurs vers la description des qualités des pigments ou de leurs complexes avec les lipoprotéines, associés à chaque étape. BRIANTAIS (1968) a passé en revue les travaux qui ont abouti à l'isolement de particules enrichies en photosystèmes I ou II.

Les associations de molécules

L'hétérogénéité de la chlorophylle a été décrite *in vitro* également ; en solution dans certains solvants organiques coexistent des monomères et des dimères ; des colloïdes et des agrégats se forment quand change la nature du solvant. Les films de molécules étalées à la surface de l'eau ou adsorbées sur des substances synthétiques apportent de nombreux renseignements sur les conformations possibles des chlorophylles (KE, 1966).

On peut également énumérer certaines propriétés qui permettent aux pigments de se lier à leur entourage. SEELY (1966) décrit les possibilités réactionnelles des chlorophylles. Nous donnons dans la figure 1 quelques exemples d'associations possibles.

- Tout d'abord, les pigments peuvent s'associer entre eux.

La présence de Mg dont le pouvoir de coordination n'est pas satisfait par ses liaisons avec le cycle porphyrinique peut donner lieu à la formation de dimères (ou même de trimères dans le cas de la chlorophylle *b*) par l'intermédiaire de molécules d'eau (KATZ et BALLSCHMITER, 1968, GURINOVICH et STRELKOVA, 1968). La liaison entre deux molécules de chlorophylles peut se faire entre le Mg de l'une et un azote d'un noyau pyrrol ou le groupement cétonique en C-9 d'une autre. Les parties phytoliques des chlorophylles, les caroténoïdes, les acides gras des constituants lipidiques peuvent s'assembler par interactions hydrophobes : dans les solutions aqueuses les groupements non polaires ont tendance à s'associer de manière à réduire la surface de contact avec les molécules d'eau environnantes (NEMETHY, 1967).

- Les pigments peuvent se lier à leurs voisins, les composés lipidiques et protéiques.

On peut remplacer les phospholipides du modèle de BOTHOREL et LUSSAN (1968) par des galactolipides, constituants des lamelles chloroplastiques et imaginer

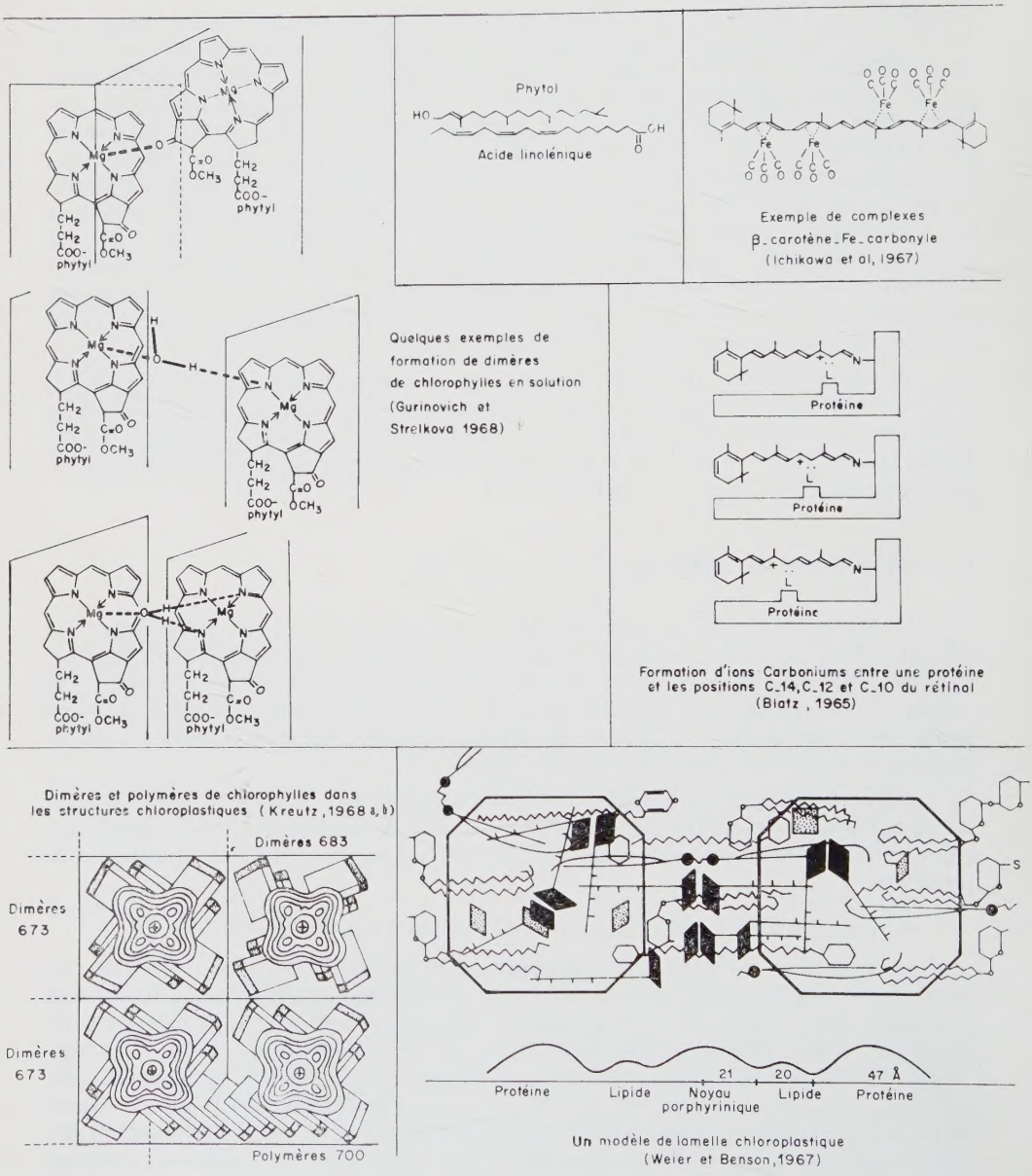


FIG. 1. — Quelques exemples de relations entre les molécules de pigments et leur environnement.

le même mode de relations entre lipides et protéines par les résidus aromatiques. Des liaisons hydrogènes peuvent également se former. Les pigments, tous systèmes de doubles liaisons conjuguées, peuvent s'associer avec les groupements électrophiles des chaînes latérales d'acides aminés. Selon la position des ions carboniums entre une molécule de rétinal et une protéine, BLATZ (1965) a tenté d'expliquer

comment le maximum d'absorption peut se situer à 3 longueurs d'onde très différentes (650, 545 et 440 nm). Les variations de maximums d'absorption dans le chloroplaste sont beaucoup plus discrètes. Avec les électrons de l'oxygène des groupements C = O des chaînes peptidiques, on peut imaginer également des liaisons par l'intermédiaire de complexes π-métalliques cependant moins stables que les complexes Fe-carbonyles de β-carotène (ICHIKAWA, TSUTSUI et VOHWINKEL, 1967).

Les atomes d'oxygène des xanthophylles (hydroxyles et époxydes) et des chlorophylles (carbonyles) les rendent plus aptes à se lier aux protéines ; le groupement formyle en C-3 dans la chlorophylle *b* confère une capacité de liaison plus grande que le méthyle de la chlorophylle *a*.

On arrive ainsi à la constitution de modèles de lamelles granaires dont la cohésion est assurée, selon les auteurs, par les constituants protéiques, par les éléments lipidiques ou par les lipides et les protéines bien intriqués (MÜHLETHALER, MOOR et SZARKOWSKI, 1965 ; MENKE, 1966 ; PARK, 1966 ; THOMAS, VAN LIEROP et TEN HAM, 1967 ; WEIER et BENSON, 1967 ; KREUTZ, 1968 *b*).

L'hétérogénéité métabolique

Depuis quelques années, on parle aussi d'hétérogénéité métabolique. Dans une catégorie de composés chimiquement bien définie, une partie peut avoir une origine ou une destinée différente du reste des molécules. C'est cette hypotèse que proposent SIRONVAL, VERLY et MARCELLE (1961), MICHEL-WOLWERTZ (1963) après l'étude de la photooxydation de la chlorophylle et DURANTON (1966) qui calcule la proportion de chlorophylle *a* transformée en chlorophylle *b* au cours du verdissement. Les travaux les plus détaillés sur ce sujet ont été conduits par SHLYK et ses collaborateurs à Minsk ; nous nous sommes intéressés particulièrement à la technique d'extraction ménagée qui permet de maîtriser la séparation des molécules de chlorophylles de leurs sites de liaison aux structures végétales ; couplée à un marquage des pigments par un traceur radioactif, elle permet de décrire à la fois l'hétérogénéité structurale et l'hétérogénéité métabolique.

- Les travaux des chercheurs russes seront résumés au début du chapitre suivant consacré à la *description de l'extraction ménagée*. Nous avons centré notre effort sur un matériel végétal unique, le Blé, afin d'étudier les divers facteurs qui peuvent influencer la séparation progressive des pigments de leurs sites d'insertion.

- Nous avons dû faire subir quelques *modifications aux techniques classiques de traitement des pigments* pour la détermination de la radioactivité qu'ils ont incorporée.

- L'originalité de notre travail consiste en *l'extension et l'approfondissement des propriétés d'hétérogénéité structurale et d'hétérogénéité métabolique des pigments liposolubles des chloroplastes*. La définition de l'hétérogénéité de la chlorophylle *a* a été améliorée, particulièrement en ce qui concerne les molécules néoformées ; le marquage par le tritium ouvre des perspectives sur le rôle photochimique d'une autre forme de chlorophylle. L'hétérogénéité des caroténoïdes, en général, constitue un apport nouveau. Le cas particulier du β-carotène, naturellement soluble dans un hydrocarbure, a mis en jeu l'extraction à différentes températures ; ceci ouvre la possibilité de mesurer les enthalpies de liaison.

Ainsi, nous pouvons proposer une *technique générale :* divers mélanges de solvants appliqués selon leur polarité croissante ou décroissante, à une température donnée ou à différentes températures permettent de définir des compartiments à l'intérieur de chaque catégorie de pigments. On peut aussi prévoir une extension de la méthode à d'autres composés liposolubles, voisins des pigments dans les lamelles chloroplastiques ; et l'étude des associations ainsi détruites par des solvants ouvre une porte sur la connaissance de la structure moléculaire des organites photosynthétiques.

• L'ensemble de nos résultats débouche sur la *signification physiologique* de l'hétérogénéité. La définition des compartiments métaboliques proposée conduit à des hypothèses sur les relations entre ces compartiments.

II. L'EXTRACTION MÉNAGÉE

La traversée d'un chloroplaste par un solvant polaire comme l'acétone entraîne brutalement toutes les molécules de chlorophylles en les mélangeant. Le même traitement par de l'éther de pétrole ne détache qu'une partie des pigments. Dès 1950, GODNEV, TERENT'EVA et PARMON indiquent que 5 à 10 % de la chlorophylle des feuilles de Tournesol, de Maïs et d'Epinard, 26 à 38 % de celle des limbes de Vigne, de Chêne, de Cerisier sont extractibles par l'éther de pétrole ; ils supposent que cette partie du pigment est en « solution lipoïdique » dans les chloroplastes, le reste étant lié aux protéines. Dans l'étude cinétique de l'extraction de la chlorophylle par l'éther de pétrole ou l'hexane, SHLYK et PRUDNIKOVA (1958) distinguent une phase rapide suivie d'une autre plus lente ; ceci leur permet de formuler l'hypothèse de l'existence de plusieurs formes de chlorophylles.

Si l'on augmente progressivement la polarité du mélange extracteur, en ajoutant de l'éthanol dans l'éther de pétrole, les chlorophylles quittent par étapes leurs sites habituels d'insertion dans le chloroplaste pour passer en solution. SAPOZNIKOV et CHERNOMORSKY ont décrit, en 1960, les premières *extractions ménagées*. Par cette technique, on peut fractionner le stock total des molécules de pigment, comparer les quantités extraites ainsi que la composition en substances accompagnatrices, comme les lipides ; de plus, on peut déterminer les qualités spectrales ou l'enrichissement en traceurs des molécules mises en solution par chaque mélange extracteur.

L'exposé de notre contribution à la mise au point de la technique d'extraction ménagée sera précédé d'un résumé des travaux de nos prédécesseurs russes.

A. LES TRAVAUX DU GROUPE DE MINSK

L'hypothèse d'une hétérogénéité métabolique de la chlorophylle apparaît dès 1957 (SHLYK *et al.*) ; puis elle est déduite de l'analyse des cinétiques d'enrichissement en ^{14}C des chlorophylles *a* et *b* après suppression du radioisotope (SHLYK, 1961 ; SHLYK et FRADKIN, 1961, 1962). Le marquage des pigments est obtenu après photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$ dans l'atmosphère pour les feuilles des plantes aériennes, ou avec du ^{14}C-bicarbonate dans le milieu liquide pour les organes photosynthétiques de plantes aquatiques.

En 1961, SHLYK et PRUDNIKOVA trouvent que la chlorophylle extraite de feuille d'Oignon par l'hexane est plus marquée que le reste du pigment mis en solution ensuite par l'acétone. Ces résultats sont confirmés par le fractionnement en 4 groupes successifs de la chlorophylle *a* de Betterave (SHLYK et NIKOLAEVA, 1962) ; les molécules nouvellement synthétisées, car plus marquées, extractibles par les solvants peu polaires (forme I), sont plus sensibles à l'action destructrice de la chlorophyllase ou d'un éclairement intense que le reste des molécules extractibles par l'acétone (forme II). Ces mêmes auteurs, dans deux publications de 1963 (*a* et *b*), précisent qu'il y a passage graduel d'une forme à l'autre quand on mesure les radioactivités spécifiques des chlorophylles extraites par une série de solvants de polarité croissante ; de plus, les radioactivités spécifiques des formes I et II convergent après 24 h d'obscurité à la température ordinaire, après 4 h d'obscurité à 40 °C, ou après 5 jours de lumière ; de même, la différence entre les radioactivités spécifiques s'atténue quand les chlorophylles sont fabriquées à partir des réserves marquées de la Betterave, ou bien lors du verdissement de feuilles étiolées d'Orge. Les molécules de chlorophylle *a* les plus marquées disparaissent après un traitement par les ultrasons ou à l'obscurité (SHLYK et BALEVA, 1965). Chez les Euglènes, il y a « phéophytinisation » sélective de ces mêmes molécules enrichies en ^{14}C (SHLYK, BARANOV *et al.*, 1967 ; SHLYK et SUKHOVER, 1968). Au cours du fractionnement par centrifugation différentielle d'homogénats de feuilles, les particules les plus petites sont enrichies en molécules néoformées de chlorophylle *a* (SHLYK, FRADKIN *et al.*, 1966). La présence de protochlorophyllide dans ces petites particules (SHLYK et SAVCHENKO, 1967) serait en accord avec l'hypothèse de centres particuliers de la biosynthèse de la chlorophylle (SHLYK, FRADKIN *et al.*, 1967 ; SHLYK, VLASENOK *et al.*, 1967 ; SHLYK, PRUDNIKOVA *et al.*, 1968) d'autant plus qu'il semble que ce soient les molécules de chlorophylle *a* les plus marquées qui donnent naissance à la chlorophylle *b* à l'obscurité (SHLYK et STANISHEVSKAYA, 1962, FRADKIN, SHLYK et KOLYAGO, 1966, SHLYK et PRUDNIKOVA, 1967). Nous montrerons par la suite que l'effort actuel de ces auteurs pour relier la forme facilement extractible de chlorophylle au système I de la photosynthèse repose sur des bases très fragiles. Au contraire, le fait que ces molécules soient nouvellement apparues se traduit par un enrichissement plus rapide en ^{14}C et ne semble plus faire de doute ; leur liaison avec les structures chloroplastiques est faible ; en effet, ces molécules et leur micro-environnement sont solubles dans le mélange le moins polaire quel que soit l'ordre d'emploi des solvants sur des cellules de Chlorelles (SHLYK et MIKHAILOVA, 1967).

B. CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'EXTRACTION MÉNAGÉE

Le paragraphe précédent fait ressortir la variété des renseignements apportés par SHLYK et ses collaborateurs sur les propriétés de la fraction néoformée de chlorophylle ; mais en contrepartie, les précisions techniques manquent souvent de clarté dans leurs articles. Nos premiers essais nous ont rapidement montré la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles lors des répétitions. Nous avons donc essayé de standardiser le mode opératoire et ainsi étudié quelques facteurs qui exercent une influence sur cette technique.

1. Le matériel végétal

Nous avons centré notre effort sur le Blé, variétés *Florence Aurore* et *Guelma* ; nous le cultivons sur solution nutritive complète et sous éclairement artificiel (7 000 - 10 000 lux) pendant 13 jours (FERRON, VAN ASSCHE et COSTES, 1967). La photopériode est de 15 h. A cet âge, la jeune plante a deux feuilles bien développées. Au cours de notre travail, nous avons utilisé ces parties aériennes et nous avons fait des extractions ménagées de pigments successivement à partir :

— de feuilles fraîches

. broyées à la main dans un mortier,

. broyées puis agitées mécaniquement ;

— de préparations chloroplastiques auxquelles nous ajoutions du silicagel en poudre pour adsorber l'eau ;

— de préparations chloroplastiques cryodesséchées ;

— de feuilles lyophilisées entières puis réduites en poudre fine par broyage.

Les deux premiers modes opératoires sont décrits en 1964 (DEROCHE-LABORIE, COSTES, FERRON), le troisième en 1967 (DEROCHE).

Les feuilles fraîches se prêtent mal aux répétitions ; cependant, nous avons pu en tirer des renseignements intéressants particulièrement lors des marquages par $^{14}CO_2$ et $^{3}H_2O$. La préparation des chloroplastes présente un grand intérêt pour l'étude de l'hétérogénéité des lipides, mais par rapport aux feuilles d'où les organites sont extraits, la perte de matériel chlorophyllien est considérable. La cryodessiccation des feuilles nous permet de partir de poids plus faibles de végétal particulièrement pour les essais sur plantes étiolées en cours de verdissement ; elle est satisfaisante pour l'étude des chlorophylles et des caroténoïdes dont la localisation intrachloroplastique est certaine.

Nous avons fait quelques essais sur des préparations chloroplastiques de feuilles de différentes plantes : Maïs, Melon, Betterave, Tomate, Poivron ; la technique d'extraction ménagée est applicable à d'autres végétaux que le Blé.

2. Mode opératoire actuel

La préparation des chloroplastes est décrite par ARNON et *al.* (1956) et employée par de nombreux auteurs. Le tampon phosphate M/15 de pH 7,17 contient du NaF 10^{-4} M, inhibiteur des phosphatases. Après broyage et filtration sur gaze, une première centrifugation de 3 minutes à 100 × g sépare un surnageant qui est prélevé et soumis à une deuxième centrifugation à 1 000 × g pendant 10 minutes ; ce dernier culot est conservé et mis à cryodessécher pendant une nuit dans un appareil mis au point par VARTAPETIAN (1960).

Les préparations chloroplastiques lyophilisées sont dispersées dans du sable : les feuilles cryodesséchées sont réduites en poudre par broyage à sec avec du sable dans un mortier ; ce mélange de sable et de poudre végétale est placé dans une colonne contenant déjà une couche de 20 g de sable qui joue le rôle de filtre. La percolation des mélanges extracteurs se fait dans l'ordre et les proportions décrits (DEROCHE, 1967), c'est-à-dire des volumes égaux de mélanges d'éther de pétrole et d'éthanol ou d'acétone dont l'enrichissement en solvant polaire croît par paliers. Particulièrement dans le cas des feuilles finement pulvérisées, une centrifugation rapide du premier effluent est nécessaire pour éliminer quelques éléments figurés très petits entraînés mécaniquement à travers le sable par le front du solvant.

ZINSOU (1968) a amélioré le système d'alimentation en solvants et réglé le débit de l'effluent (fig. 2). Les colonnes à doubles parois sont nécessaires pour les extractions à des températures contrôlées.

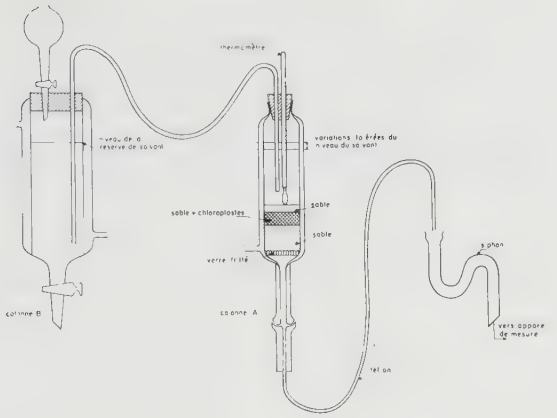


FIG. 2. — Schéma du dispositif amélioré par Zinsou (1968), servant à l'extraction ménagée des pigments de chloroplastes cryodesséchés. Le réglage du débit est assuré par :
— une alimentation continue par un vase de Mariotte,
— un tube de téflon (diamètre intérieur : 1,1 mm) forcé dans un tube capillaire de verre muni d'un rodage sphérique à la base de la colonne A ; l'étanchéité est assurée par un joint de téflon.
Les doubles parois de la réserve et de la colonne A, contenant le sable et les chloroplastes, permettent de régler la température d'extraction.

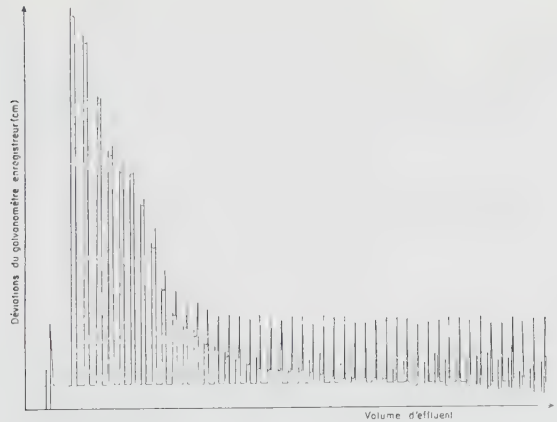


FIG. 3. — Courbe d'enregistrement automatique de la richesse en pigment de l'effluent à la sortie de la colonne A (fig. 2). La longueur d'onde du monochromateur est réglée à 476 nm pour le β-carotène. Le premier tube contient le solvant pur et sert à établir la ligne zéro (abscisses). Les déviations du galvanomètre qui s'enregistrent en ordonnées sont fonction de la concentration en pigment dans chaque siphonnat de 1,8 ml. En partant de la gauche vers la droite, on enregistre successivement les déviations correspondant :
— au tube plein d'air,
— au passage du ménisque inférieur du solvant,
— au tube plein de solvant, puis de solvant contenant les pigments,
— au passage du ménisque supérieur.

La richesse de l'effluent en pigments est suivie sur l'appareil enregistreur qui sert habituellement au dosage automatique des caroténoïdes (COSTES, 1965). On règle la longueur d'onde :

— à 651 nm, point d'intersection des spectres des deux chlorophylles dans l'éther de pétrole,

— à 476 nm (fig. 3), maximum d'absorption secondaire du β-carotène ; à cette longueur d'onde, la chlorophylle *a* absorbe peu, mais on ne doit pas négliger l'absorption de la lutéine ; en effet, une partie de cette xanthophylle est éluée par l'éther de pétrole à la température ambiante (fig. 4).

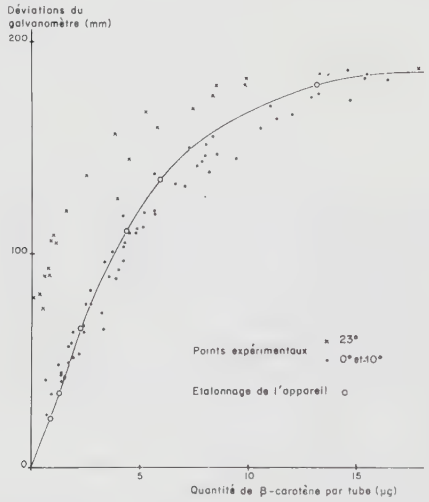


FIG. 4. — Courbe d'étalonnage en β-carotène des déviations du galvanomètre enregistreur ; le monochromateur est réglé à 476 nm. *L'étalonnage* a été fait avec des solutions de β-carotène pur de concentrations connues. *Les points expérimentaux* correspondent aux déviations enregistrées lors du fractionnement de l'effluent éthéropétrolique d'une colonne de sable et de chloroplastes cryodesséchés ; les dosages de ces fractions en β-carotène sont effectués après chromatographie de l'effluent sur colonne de cellulose. On obtient une bonne concordance quand l'extraction est faite à basse température ; à la température ambiante, la lutéine accompagne le β-carotène.

3. Expression des résultats

3.1. Nous appellerons *courbe d'extraction ménagée* la représentation graphique dans laquelle :

— les abscisses correspondent à la polarité des solvants d'extraction ; chaque mélange : éther de pétrole et éthanol (ou acétone), est représenté par une longueur égale à celle du précédent ou du suivant puisque les volumes appliqués sont égaux. Les chiffres portés sur ces portions égales d'abscisses indiquent la proportion (%) en volume du solvant le plus polaire ajoutée à l'éther de pétrole ; le dernier solvant d'extraction est l'acétone pure dans le cas de feuilles fraîches, ou l'acétone contenant 20 % d'eau pour le matériel lyophilisé ;

— les ordonnées indiquent les quantités de pigments mises en solution par chacun des mélanges extracteurs ; on les a exprimées en poids (µg) de pigments extraits par mélange ; en ce cas le poids de matériel végétal soumis à l'extraction ménagée est précisé dans la légende comme dans les figures 14, 18 et 19. Lorsqu'on a comparé deux séries de mélanges extracteurs (fig. 6), ou le conditionnement du végétal (fig. 9 et 17), les ordonnées correspondent au pourcentage de pigment total extrait par chaque mélange ; la somme des quantités extraites par tous les mélanges est égale à 100 %.

Si les molécules de pigments présentaient des différences très grandes dans leurs forces

de liaison aux structures chloroplastiques, on arriverait à distinguer les groupes de chlorophylles sous forme de pics séparés dans les courbes d'extraction ménagée. Nos résultats permettent de penser à un passage progressif d'une forme à l'autre. Cependant, lorsqu'un lot de molécules de chlorophylles ne passe en solution que dans un mélange extracteur de polarité élevée, on peut dire que l'énergie de liaison de ces molécules pigmentaires aux structures chloroplastiques est grande ; cette énergie est plus grande que celle d'un lot de molécules extrait par un solvant moins polaire. Il doit exister une relation simple entre l'énergie de liaison des pigments à leurs sites d'insertion dans le chloroplaste et la polarité du solvant capable de rompre ces liens.

Dans certaines expériences, nous avons aussi déterminé les radioactivités spécifiques des fractions de pigments mis en solution par chaque mélange extracteur (ou par groupe de quelques mélanges appliqués successivement) ; dans ce cas, nous avons ajouté une ligne d'ordonnées supplémentaires (fig. 14, 18 et 19).

3.2. Nous appelons *courbe d'épuisement* (fig. 7 et 8) la représentation graphique d'essais d'extraction complète d'un pigment par traitements répétés avec un mélange de polarité donnée à une température déterminée ; dans ce cas, nous avons porté :

— en abscisses, le volume de solvant employé, en cumulant les quantités employées successivement ;

— en ordonnées, les pourcentages de pigment mis en solution par les volumes correspondants ; pour cela, on cumule les pourcentages extraits par les volumes élémentaires.

4. Etude de quelques facteurs intervenant dans l'extraction ménagée

4.1. Les solvants

4.1.1. Leur nature

4.1.1.1. Comme *solvant peu polaire,* nous avons généralement utilisé l'éther de pétrole (E : 50° - 60°), mélange dans lequel l'hexane est prédominant. Comme la quasi-totalité du β-carotène des chloroplastes cryodesséchés est extraite par l'éther de pétrole, nous avons comparé les courbes d'épuisement par le *pentane* ou par *l'hexane ;* elles sont superposées (fig. 5) ; en effet, les constantes diélectriques de ces 2 hydrocarbures sont très voisines (hexane 1,890 ; pentane 1,844, à 20 °C).

4.1.1.2. Les *solvants polaires* utilisés sont *l'éthanol* et *l'acétone ;* le premier était préconisé par Sapoznikov et Chernomorsky (1960). Nous avons observé qu'il faut 10 fois plus d'acétone que d'éthanol pour obtenir des courbes d'extraction ménagée qui ne laisse pas apparaître de différences significatives dans le passage en solution des chlorophylles (fig. 6) ; ces deux solvants diffèrent par leurs constantes diélectriques (acétone : 20,7 ; éthanol : 24,3, à 25 °C), leurs groupements fonctionnels (= O, −OH), leurs encombrements moléculaires, l'énolisation de l'acétone, la faible solubilité des phospholipides dans l'acétone ; mais on ne s'attendait pas à une telle différence de quantité à employer dans l'extraction ménagée.

La présence *d'eau* dans le matériel végétal augmente la polarité des solvants employés et en conséquence leur pouvoir extracteur. Les substances mises en solution, pigments et lipides incolores, interviennent également.

4.1.2. Leur volume

En contradiction avec les promoteurs russes de la technique, nous avons observé, dès nos premiers essais qu'en prolongeant ou en répétant l'application d'un solvant donné, même l'éther de pétrole seul (fig. 7), on solubilise toujours un

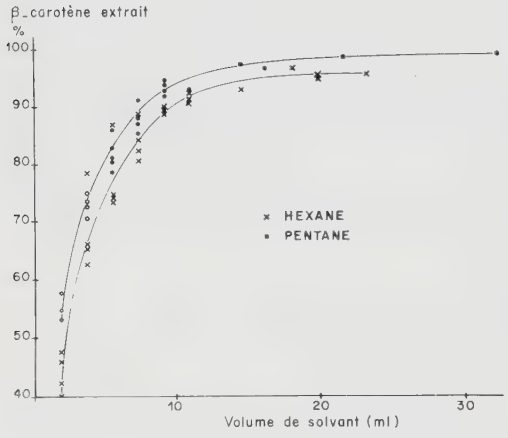


FIG. 5

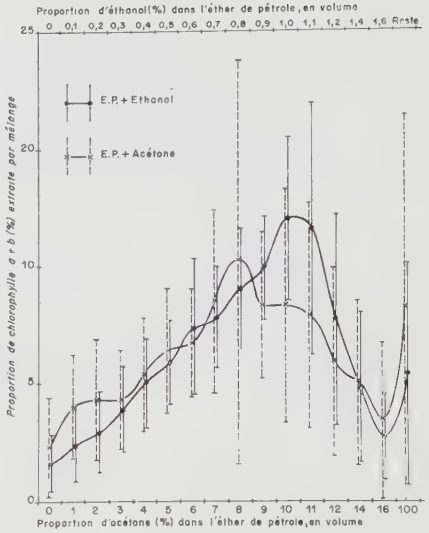


FIG. 6

FIG. 5. — Extractibilité du β-carotène de chloroplastes lyophilisés par le pentane et par l'hexane à la température ambiante.
Entre les premiers points de chacune des courbes la différence est nette : 1,8 ml d'hexane extraient moins de β-carotène que le même volume de pentane. Pour tous les points suivants, les écarts-types se chevauchent : on ne distingue plus de différence dans le pouvoir extracteur de ces deux solvants.

FIG. 6. — Comparaison des courbes d'extraction ménagée de feuilles fraîches obtenues avec des volumes égaux de mélanges d'éther de pétrole et d'*éthanol* (moyennes de 20 essais) ou d'éther de pétrole et d'*acétone* (moyennes de 12 essais). Nous avons porté de chaque côté des valeurs moyennes ± leurs écarts-types, ce qui montre que les deux courbes ne sont pas significativement différentes.

peu de chlorophylle ; certes la proportion de pigment extrait est de plus en plus faible, mais elle est bien décelable par fluorescence même après de nombreuses répétitions. Nous avons donc cherché le volume optimum de solvant à employer.

4.1.2.1. *Recherche de la quantité maximum de chlorophylle extraite par un mélange de polarité donnée*

Que l'on s'adresse à des feuilles fraîches ou à des chloroplastes lyophilisés (fig. 7), on n'extrait jamais la totalité des chlorophylles avec des solvants peu polaires. Nous avons généralement interrompu l'extraction après n répétitions quand le volume de solvant de rang n ne contenait pas plus de 1 % du pigment total du matériel végétal.

Les courbes d'épuisement représentant les proportions extraites en fonction du volume semblent tendre vers des paliers. C'est un argument en faveur de l'existence d'une hétérogénéité de liaison des pigments aux chloroplastes. En effet, si nous avions affaire à des cristaux de chlorophylles lessivés par un solvant constamment renouvelé, les courbes d'épuisement seraient des droites passant par l'origine, plus ou moins inclinées sur l'axe des abscisses selon la polarité du solvant, et aboutissant plus ou moins vite à la même valeur des ordonnées : 100 % de pigment mis en solution.

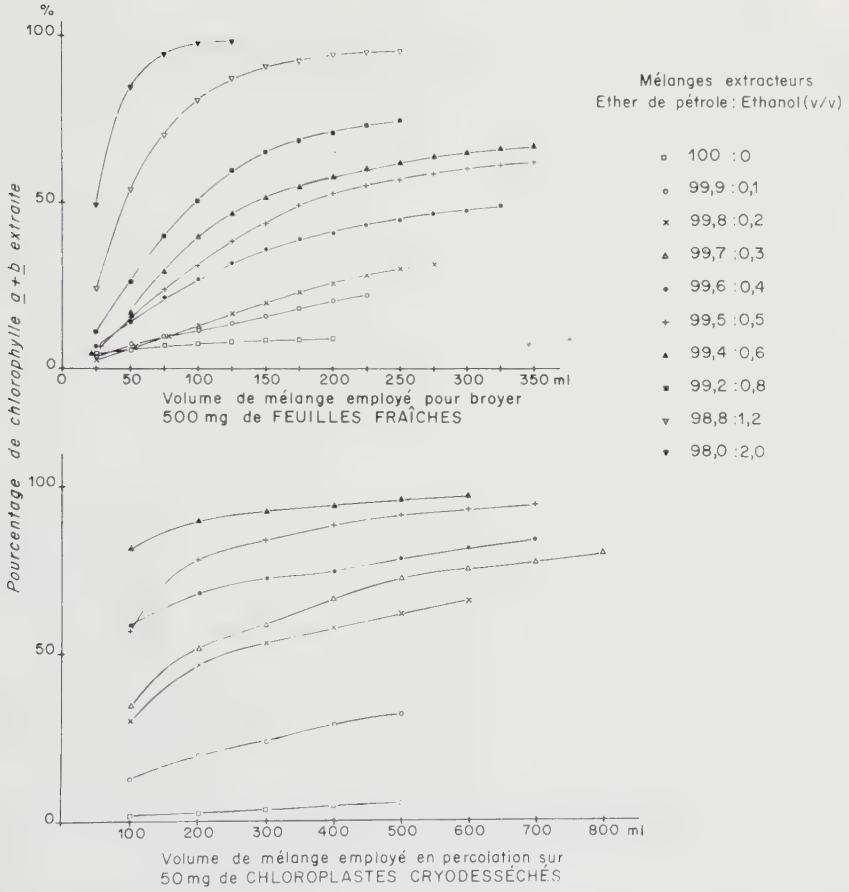


FIG. 7. — Courbe d'épuisement des chlorophylles de feuilles fraîches et de chloroplastes cryodesséchés par applications successives de volumes égaux d'un solvant donné. Les courbes obtenues avec l'éther de pétrole sont semblables ; mais, après cryodessiccation, les mélanges suivants contenant 1 ou 2 pour mille d'éthanol extraient beaucoup plus de chlorophylle que lors de leur emploi sur des feuilles fraîches.

Finalement, nous avons déterminé des quantités égales de mélanges de polarité croissante à employer successivement. Le rapport entre le volume (en ml) de chaque mélange et le poids (en mg) de chlorophylle $a + b$ de l'échantillon est d'environ 50.

4.1.2.2. *Fractionnement de l'effluent éthéropétrolique*

Une des premières conséquences de la cryodessiccation que nous avons observée est le passage en solution de la quasi-totalité (98 %) du β-carotène dans le volume habituellement employé. Pour savoir si une hétérogénéité plus fine n'était pas masquée dans cet extrait global, on a fractionné l'effluent éthéropétrolique en volumes plus petits et enregistré la teneur en pigments (fig. 8). Nous avons surtout utilisé ce moyen de contrôle dans les expériences à basse température.

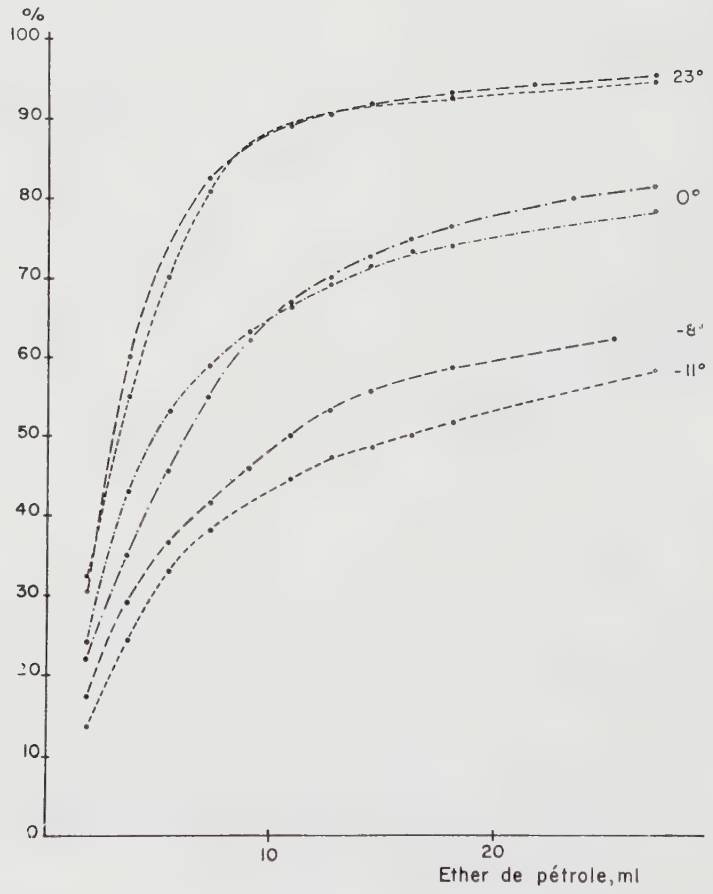


FIG. 8. — Courbe d'épuisement du β-carotène de chloroplastes cryodesséchés par l'éther de pétrole ; les différentes températures indiquées sont celles du solvant d'extraction et de l'ensemble de la colonne de sable et de préparation chloroplastique (fig. 2).

4.2. **La température**

La plus grande partie de ce travail a été faite à la température ambiante : 20 à 25 °C.

4.2.1. Les effets d'une *élévation de température* ont été utilisés pour rompre les liaisons entre les pigments et les lipoprotéines chloroplastiques. Il s'agit là d'un choc thermique incompatible avec la conservation de la structure des protéines. La proportion de chlorophylles et de caroténoïdes extractibles par l'éther de pétrole de feuilles soumises ainsi à ce traitement augmente considérablement par rapport à ce qui se passe pour les feuilles fraîches (tableau I).

Outre la dénaturation des lipoprotéines chloroplastiques, il y a dans ces résultats au moins deux facteurs non indépendants : l'augmentation de température et la diminution de la teneur en eau du matériel végétal.

TABLEAU I

Pourcentage de chaque pigment extractible par l'éther de pétrole à partir de matériel végétal différemment conditionné.

	Feuilles fraîches	Feuilles dénaturées 1/4 h à 100 °C	Feuilles lyophilisées	Chloroplastes lyophilisés
Chlorophylle ($a+b$)	2	48	4	1
Caroténoïdes totaux	12	22		55
β-carotène	49	95		99
Lutéine	6	51		27
Epoxylutéine	1	94		9
Violaxanthine	2	52		10
Néoxanthine	1	21		3

4.2.2. A l'opposé, *l'abaissement de la température* d'extraction a servi à déplacer l'équilibre de dissociation entre le β-carotène et les structures chloroplastiques. Les courbes (fig. 8) représentant la proportion de pigment extraite en fonction du volume de solvant employé à différentes températures (−10 °, 0 ° et 23 °C) ont des formes comparables à celles des essais d'épuisement de la chlorophylle par les divers mélanges de polarité donnée (fig. 7) ; à une température donnée, seulement un lot de molécules de β-carotène passe des chloroplastes en solution dans l'éther de pétrole. SAPOZNIKOV *et al.* (1962) ont montré que du β-carotène est extractible jusqu'à −50 °C à partir de feuilles de certains Conifères, jusqu'à −15 ° à partir de feuilles de Maïs.

Les variations contrôlées de température (T) modifient la valeur de la constante de dissociation (k) entre les pigments et leurs sites d'insertion. Nous étudierons, dans le chapitre consacré à l'hétérogénéité du β-carotène, les variations de Log k en fonction de 1/T.

4.3. La teneur en eau du matériel végétal

En 1960, SAPOZNIKOV et CHERNOMORSKY ont proposé de classer les plantes selon la polarité du premier mélange à employer pour extraire la chlorophylle ou selon la forme des courbes d'extraction. Or, avec l'éther de pétrole seul, nous avons toujours retiré quelques % de chlorophylle des préparations chloroplastiques des diverses plantes essayées et d'autre part, les formes de courbes d'extraction ménagée obtenues sur les feuilles fraîches de Blé sont assez variées pour nous permettre d'affirmer que ce classement des plantes est impossible tant qu'on ne maîtrise pas convenablement la teneur en eau du végétal.

Différentes manières de préparer notre matériel végétal ont été tentées dans ce sens. Quand on passe des feuilles fraîches dont la teneur en eau est d'environ 900 % du poids de matière sèche aux chloroplastes lyophilisés qui en contiennent moins de 10 %, la proportion de la chlorophylle facile à extraire par l'éther de pétrole varie peu ; *c'est la chlorophylle moyennement liée qui devient de plus en plus facilement accessible* (fig. 9). On ne peut espérer atteindre la déshydratation complète des chloroplastes. GAUDILLÈRE (1968) a montré que les préparations chloroplastiques ne contiennent plus que 1,5 % d'eau à la sortie du lyophilisateur

et qu'elles se rehydratent très rapidement lors de leur conservation. Il semble que les feuilles lyophilisées entières se déshydratent mieux par cryodessiccation que les chloroplastes qui se présentent sous forme d'une poudre toujours hygroscopique.

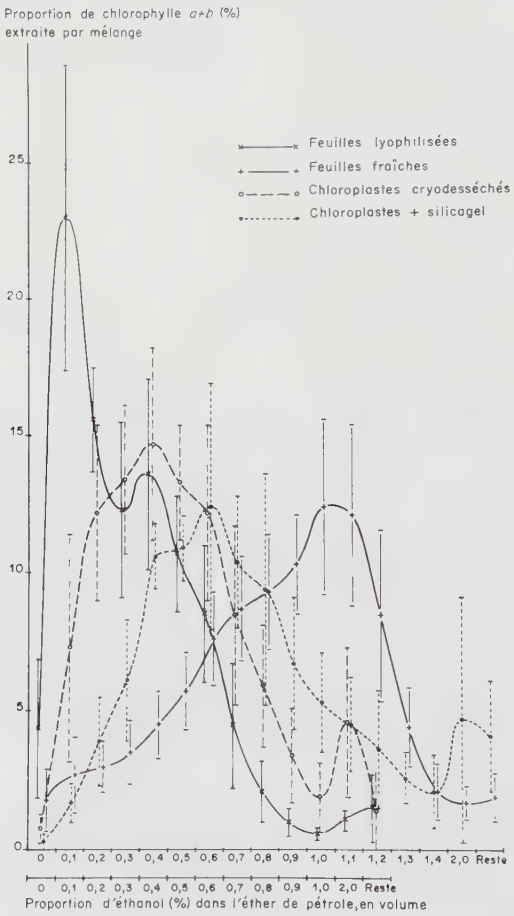


FIG. 9. — Influence de la teneur en eau sur la forme des courbes d'extraction ménagée de feuilles et de préparations chloroplastiques. Les valeurs moyennes correspondent à 7 essais pour les feuilles lyophilisées, à 17 essais pour les chloroplastes cryodesséchés, à 15 essais pour les chloroplastes déshydratés par le silicagel, à 17 essais pour les feuilles fraîches. Autour de chaque valeur moyenne est indiqué ± l'écart-type.

4.4. **Autres facteurs**

4.4.1. AGE DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

Nous avons fait l'essentiel de notre travail sur des feuilles de Blé de 13 jours car il semble bien que l'âge des feuilles intervienne sur les pourcentages extraits, de même que l'heure du prélèvement ; nous ne pouvons pas tirer de conclusions précises car la plupart des essais ont été faits sur des feuilles fraîches et le nombre des répétitions n'est pas suffisant.

TABLEAU II

Pourcentage de chlorophylles (a + b) *extraits de limbes de Blé lyophilisés prélevés sur des plants d'âges différents.* La numérotation des limbes correspond à l'ordre d'apparition (E.P. = éther de pétrole).

Age du Blé (jours)			7	10	13	16
Limbe n° 1	Chlorophylle	extractible par E.P. ..... (I)	1	4	7	3
		extractible par E.P. + éthanol (0,1 à 2,0 %) ..... (II)	91	94	92	88
		extractible par l'acétone ...(III)	8	2	1	9
Limbe n° 2	Chlorophylle	extractible par E.P. ..... (I)			1	3
		extractible par E.P. + éthanol (0,1 à 2,0 %) ..... (II)			89	87
		extractible par l'acétone ...(III)			10	10

D'une manière générale on a remarqué un comportement opposé entre les formes I et III ; ceci est illustré par le tableau II ; si l'on obtient peu de chlorophylle facile à extraire par l'éther de pétrole (forme I), il reste beaucoup de chlorophylle très liée (forme III) après passage des mélanges d'éther de pétrole et d'éthanol ; l'emploi d'un solvant très polaire : acétone pure ou contenant 20 % d'eau est nécessaire pour détacher cette forme III des structures chloroplastiques. Au contraire, un pourcentage de forme I s'approchant de 10 % correspond à une proportion faible de forme III.

4.4.2. CONDITION DE PRÉPARATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

La cryodessiccation apporte une amélioration importante de la technique. Dans notre laboratoire, ZINSOU (1968) a étudié la *conservation,* pendant 2 mois, de préparations chloroplastiques lyophilisées, sous pression réduite ou en atmosphère d'azote ; il n'observe pas de variation de la teneur en chlorophylles *a* et *b* pendant ce temps ; cependant la teneur en lutéine diminue de 20 à 25 % et l'extractibilité du β-carotène par l'éther de pétrole à basse température est altérée. On peut cependant conserver un lot d'organites ou de feuilles cryodesséchées pendant 1 ou 2 semaines et procéder à des répétitions ce qui n'est pas possible avec le matériel végétal frais.

Le mode de préparation des chloroplastes que nous avons adopté pour sa simplicité est susceptible de modifications : dans nos conditions expérimentales, les chloroplastes perdent leurs membranes externes.

De nombreux travaux décrivent les conditions de préparation de chloroplastes intacts ; mais l'introduction de sucres, de sels ou de sérumalbumine présente l'inconvénient d'ajouter des susbstances qui peuvent intervenir, après cryodessiccation, sur la mise en solution des pigments.

Ainsi, nous avons observé dans notre laboratoire que le sable que nous considérions comme agent de dispersion ou comme filtre est doué d'une certaine capacité d'adsorption des xanthophylles ; il en est de même avec les billes de verre calibrées.

C. CONCLUSION

En résumé, la technique d'extraction ménagée peut devenir un outil précieux pour l'étude de la situation des pigments dans les chloroplastes.

L'expérimentateur doit maîtriser, un à un, les différents facteurs qui influencent les résultats obtenus par cette technique. La teneur en eau du matériel végétal est l'un des paramètres les plus importants. Par le jeu des variations de la température d'extraction ou de la polarité des mélanges, la technique peut être généralisée à tous les composants de nature lipidique du chloroplaste. Couplée à des expériences de marquage par un isotope, elle permet, de plus, l'étude de l'hétérogénéité métabolique des molécules mises en solution.

SHLYK et ses collaborateurs ont obtenu d'intéressants résultats, malgré le manque de raffinement de leur technique ; dans la plupart de leurs essais, les chlorophylles de matériel végétal frais marqué par le ^{14}C sont séparées en deux lots seulement ; le premier (I) est extrait par un mélange d'éther de pétrole et d'éthanol (0,5 ou 0,7 %) ; le second (II) représente tout le reste extrait par l'acétone. Les rapports entre les radioactivités spécifiques des chlorophylles I et II sont quelquefois très proches de 1, ce qui peut être dû à une dilution de la chlorophylle néoformée, très enrichie en traceurs ; nous montrerons dans le chapitre V que l'on peut mieux la sélectionner.

III — PRÉCISIONS TECHNIQUES SUR LE TRAITEMENT DES PIGMENTS

Avant d'exposer les résultats sur l'hétérogénéité, nous devons donner quelques indications sur les conditions de marquage, de dosage, de séparation, de purification et de comptage des pigments chloroplastiques.

A. INCORPORATION D'ISOTOPES RADIOACTIFS

Nous avons utilisé le carbone-14 et le tritium comme traceurs permettant de marquer les molécules de pigments. Les conditions de culture et d'apport de *l'eau tritiée* dans la solution nutritive du Blé ont été mises au point et décrites par FERRON, VAN ASSCHE et COSTES (1967). Nous avons fait un essai d'enrichissement du tampon phosphate M/15 (pH 7,2) des préparations chloroplastiques par de l'eau tritiée à la lumière et à l'obscurité ; les conditions de marquage des pigments par ^{3}H dans les chloroplastes isolés sont en cours d'étude actuellement.

Le ^{14}C a été fourni sous forme de $^{14}CO_2$ ou de 4-^{14}C δ-aminolévulinate de potassium.

● *Le gaz carbonique radioactif* est ajouté à l'atmosphère d'une chambre en plexiglass où croissent les parties aériennes de Blé ; nous avons aussi fait quelques incorporations de $^{14}CO_2$ par photosynthèse dans des limbes coupés dont la base plonge dans une solution nutritive (milieu de culture dilué au demi).

● *L'acide* 4-^{14}C *δ-aminolévulinique*, fourni par le C.E.A., est neutralisé par la potasse 0,1 N ; il est fourni aux limbes de Blé vert ou étiolé, par la base ; une légère dépression pendant 10 minutes assure une ascension de la totalité de la solution radioactive dans les limbes.

Les durées d'incorporation, le rapport entre les radioactivités fournies et la quantité de matériel végétal en expérience seront indiquées dans le chapitre IV avec les résultats.

B. EXTRACTION DES PIGMENTS

Ménagée ou classique, l'extraction des pigments est actuellement faite sur colonne de poudre végétale *lyophilisée* dispersée dans du sable (fig. 2). Le matériel *frais* est broyé dans un mortier. Nous prenons quelques précautions pour éviter les altérations des pigments extraits.

1 — Dans le cas d'extractions par l'acétone pure ou aqueuse (20 % d'eau) utilisée pour les extractions témoins ou pour la dernière opération d'une extraction ménagée, nous procédons immédiatement à un transfert dans l'éther de pétrole ; ainsi *les pigments liposolubles sont séparés de toutes les substances hydrosolubles* éluées par l'acétone ; chlorophyllides visibles surtout dans les feuilles étiolées en cours de verdissement, acides organiques susceptibles de provoquer la transformation des chlorophylles en phéophytines, eau tissulaire marquée...

2 — *La chlorophyllase* ne semble pas active dans nos conditions expérimentales ; nous n'avons pas observé de formation de chlorophyllides, hydrosolubles, après conservation de suspensions de chloroplastes de Blé, pendant 3 heures, à la température ambiante avec ou sans parachloromercuribenzoate signalé comme inhibiteur de cette enzyme à la concentration de 5.10^{-4} M par KLEIN et VISHNIAC (1961).

3 — Nous avons également étudié *l'influence de la lumière* sur les pigments en solution. Dans des cuves de spectrophotométrie soigneusement bouchées, nous soumettons de la chlorophylle *a* ou *b* en solution dans leurs solvants habituels (acétone aqueuse, éthanol, éther de pétrole-acétone) à trois niveaux d'éclairement (50, 100 et 5 000 lux). Les spectres sont tracés à intervalles réguliers. Nous avons établi les T_{20}, c'est-à-dire les durées d'éclairement au bout desquelles 20 % du pigment initial ont disparu.

A moins de 100 lux, niveau habituel de l'éclairement du laboratoire où se déroulent les manipulations, les T_{20} observés sont de plusieurs heures ; ces durées sont bien supérieures à celles que nous passons à extraire, doser ou séparer les pigments. S'il est besoin de conserver plus longtemps les solutions pigmentaires, nous les plaçons à l'obscurité dans une armoire réfrigérée (+4 ° à +8 °C).

On a remarqué qu'une augmentation du niveau d'éclairement ou de la température accélère la dégradation des chlorophylles. La disparition des 2 chlorophylles ne se fait pas à la même vitesse ; comme SIRONVAL et KANDLER (1958), nous observons que la chlorophylle *a* est plus photosensible que la chlorophylle *b*.

C. DOSAGE DES PIGMENTS

Les caroténoïdes sont dosés selon les techniques décrites par COSTES (1958, 1965). Après enregistrement de la richesse de l'effluent d'une colonne de sable et de poudre végétale lyophilisée (fig. 3), nous faisons précéder le dosage du β-carotène d'une chromatographie sur poudre de cellulose pour le débarrasser des traces éventuelles d'autres pigments.

Les chlorophylles a et *b* sont dosées en mélange dans l'acétone contenant 20 % d'eau, en volume, à l'aide des formules de MAC KINNEY (1941) et ARNON (1949). Ces formules sont établies pour des mélanges d'extraction acétonique complète où le rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* est compris entre 2 et 3. Or avec les solvants faiblement polaires, nous extrayons beaucoup plus de chlorophylle *a* que de chlorophylle *b* et le rapport est plus élevé. Devant le manque de renseignements bibliographiques sur cette question (VAN NORMAN, 1957), nous avons cherché si les formules étaient applicables quand le rapport varie de 1 à 6 dans des mélanges de chlorophylles en proportion connue. Les données de la figure 10 nous indiquent que, sauf pour quelques déterminations de chlorophylle *b*, les valeurs retrouvées se situent entre les limites d'erreur de ±10 % indiquées par MAC KINNEY (1941).

D. SÉPARATION DES PIGMENTS

Notre but est d'obtenir quantitativement séparés les uns des autres les chlorophylles et les caroténoïdes.

1. Partage de la solution complète en 2 lots affectés l'un à l'étude des caroténoïdes, l'autre à l'étude des chlorophylles

Au début de notre travail, nous séparions en 2 lots les solutions complètes de pigments :

1.1. Une première partie était saponifiée ; les *caroténoïdes* de l'insaponifiable étaient séparés et dosés (COSTES 1958) ; mais les chlorophylles de ce lot étaient perdues pour les manipulations ultérieures.

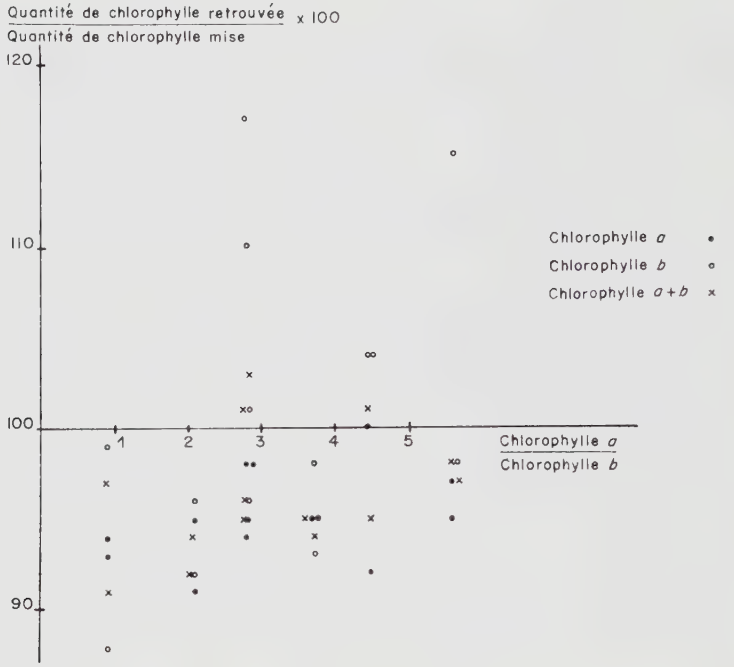


FIG. 10. — Influence de la valeur du rapport chlorophylle *a* chlorophylle *b* sur les résultats des dosages des chlorophylles en mélange dans l'acétone aqueuse (20 % d'eau en volume). Des quantités connues de chlorophylle *a* et de chlorophylle *b*, dosées en solution dans l'éther éthylique, sont mélangées ; après évaporation, elles sont reprises par l'acétone acqueuse et les quantités de pigments sont déterminées par l'emploi des formules :

$$C_a = 12{,}7.\ D_{663} - 2{,}69.\ D_{645}$$
$$C_b = 22.9.\ D_{645} - 4{,}68.\ D_{663}$$

1. 2. Le reste était consacré à l'étude des *chlorophylles*. Lors de la chromatographie sur colonne de cellulose d'une solution éthéropétrolique complète (DURANTON, GALMICHE et ROUX, 1958), il y a recouvrement partiel entre les anneaux de chlorophylle *a* et *b*, de violaxanthine et de néoxanthine. Comme nous l'avons signalé (LABORIE, 1963), le lavage de la solution éthéropétrolique par le méthanol aqueux (80 : 20, v/v) répété quatre fois élimine ces 2 xanthophylles de façon satisfaisante. Le tableau III indique le partage des pigments.

TABLEAU III

Partage des pigments entre l'éther de pétrole et le méthanol aqueux (80 : 20, v/v).

	Pourcentage de chaque pigment contenu dans :	
	l'épiphase après 4 lavages	les 4 hypophases réunies
Chlorophylle *a*	88	12
Chlorophylle *b*	45	55
β-carotène	100	0
Lutéine	24	76
Violaxanthine	0,1	99,9
Néoxanthine	0	100

Nous avons établi expérimentalement les coefficients de partage pour les chlorophylles et nous nous sommes servis de ceux de SUBBARAYAN, JUNGALWALA et CAMA (1965) pour les caroténoïdes. Les pertes en chlorophylle *b* particulièrement sont considérables ; seul le β-carotène est retenu quantitativement dans l'épiphase.

2. Séparation quantitative des pigments liposolubles en 3 groupes

Lorsque les pigments ont incorporé un radioisotope, il est souhaitable de les conserver quantitativement au cours des séparations primaires afin d'en recueillir suffisamment pour les comptages finaux qui ont lieu après purifications pendant lesquelles les pertes sont inévitables. La poudre de polyéthylène en colonne sépare convenablement les xanthophylles des chlorophylles (ANDERSON, BLASS et CALVIN, 1960, ANDERSON et CALVIN, 1962, HOLDEN, 1965) ; mais le β-carotène reste fixé au sommet de la colonne ; il est éluable par l'acétone suivie d'éther de pétrole ; il est souvent contaminé par des traces de phéophytines. Nous avons donc mis au point le protocole suivant résumé dans la figure 11, dans laquelle nous indiquons les quantités à employer.

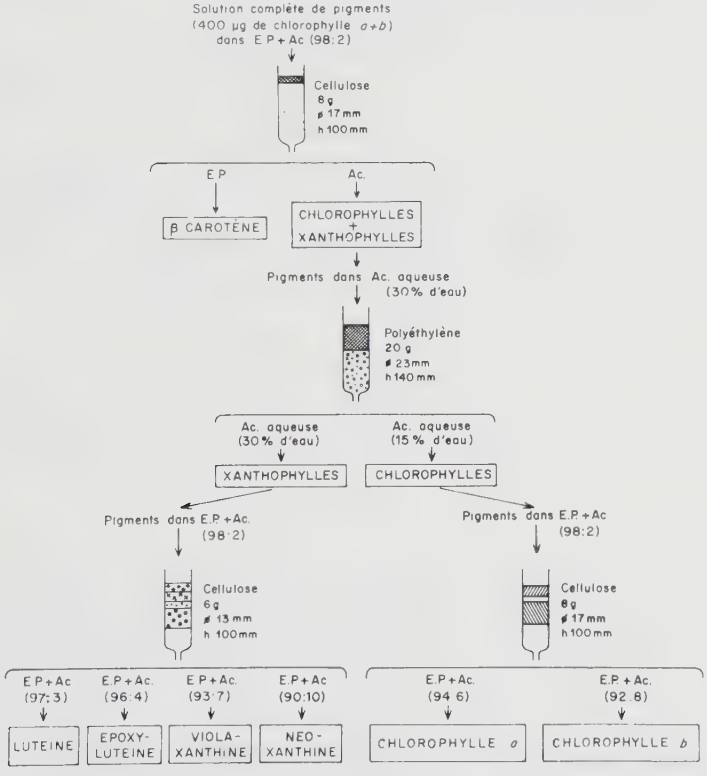


FIG. 11. — Schéma de la séparation quantitative des divers pigments liposolubles. L'ordre de passage des différents mélanges est indiqué de gauche à droite et leur composition en volume entre parenthèses. Les masses d'adsorbants correspondent à une quantité initiale de 400 µg de chlorophylle $a+b$. La poudre de cellulose est la qualité Whatman Chromedia CF 11, celle de polyéthylène est fournie par Hoescht-Peralta Abréviations : E.P. = éther de pétrole ; Ac. = acétone ; ∅ = diamètre ; h = hauteur.

2.1. Les *hydrocarbures* dont le *β-carotène*, ne sont pas adsorbés sur colonne de poudre de cellulose ; on se sert de cette propriété pour les séparer des composés hydroxylés qui sont retenus. La solution éthéropétrolique complète de pigments est déposée au sommet

d'une colonne ; le β-carotène élué par l'éther de pétrole peut être dosé à son maximum d'absorption : 449 mμ ; les substances qui l'accompagnent n'absorbent pas dans cette zone.

Le reste des pigments élués par l'acétone pure, est évaporé rapidement, mis en solution dans un faible volume d'acétone dans laquelle on ajoute 30 % d'eau.

2.2. Cette solution est versée au sommet d'une colonne de poudre de polyéthylène, soigneusement lavée au préalable par un mélange d'acétone et de 30 % d'eau, en volume. Nous avons utilisé récemment la poudre de polyéthylène basse pression PROLABO (granulométrie 0,1 à 0,5 mm) avec pleine satisfaction. *Les xanthophylles* se séparent et sont éluées les premières par l'acétone aqueuse (30 % d'eau).

2.3. Les *chlorophylles* les suivent, éluées par le mélange acétone-eau (15 % d'eau).

2.4. Chaque éluat est aussitôt agité avec de l'éther de pétrole dans une ampoule à décanter ; on lave l'épiphase par l'eau et on la déshydrate sur Na_2SO_4 sec.

Les solutions éthéropétroliques de chlorophylles d'une part, de xanthophylles d'autre part, sont chromatographiées sur des colonnes de poudre de cellulose.

Ce mode opératoire présente plusieurs avantages :

— une grande rapidité : les 4 chromatographies peuvent être réalisées dans une journée ;

— l'absence de saponification ; il n'y a pas de phytol parmi les impuretés qui accompagnent le β-carotène ;

— surtout, on ne sacrifie plus la moitié d'un groupe de pigments pour doser l'autre.

Signalons que quelques livraisons de poudre de cellulose *CHROMEDIA CF* 11 ont présenté des réactions acides : sur les colonnes, des phéophytines se forment à partir des chlorophylles et les xanthophylles époxydes s'isomérisent ou se dégradent. En ce cas, il faut laver abondamment la cellulose par l'eau, la laisser sécher à l'air. Pour apprécier la bonne qualité d'une poudre de cellulose, il suffit d'y déposer une solution de violaxanthine ; elle doit rester jaune. Si la cellulose est défectueuse, une coloration bleue apparaît.

E. PURIFICATION DES PIGMENTS

Les spectres des pigments isolés nous servent à les doser ; la position exacte des maximums d'absorption et les divers accidents des spectres nous fournissent les indications sur la bonne séparation des pigments les uns des autres. Nous avons rassemblé dans le tableau IV les coefficients d'extinction et les principales caractéristiques spectrales des solutions de pigments.

TABLEAU IV

Caractéristiques spectrales et coefficients d'extinction des pigments principaux des feuilles de Blé.

Pigment	Solvant	Maximums d'absorption (nm)						$E\,\frac{1\ \%}{1\ cm}$ au maximum en italique
β-carotène	éther de pétrole	425 (épaulement)		*449*			476	2 560
Lutéine.....	éthanol	422		*444*			472	2 550
Violaxanthine	éthanol	418		*441*			470	2 550
Chlorophylle *a*	éthanol	418 (épaulement)	432	584	618	*665*		817
Chlorophylle *b*	éthanol		463		597	*648*		397

1. Les caroténoïdes

Selon les indications de COSTES (1965), avant les comptages de radioactivité, nous avons purifié :

- le β-*carotène* sur colonne d'Alumine (Merck) ;
- la *lutéine* sur colonne de carbonate de calcium (Prolabo).

Les pigments suivants : *violaxanthine, époxylutéine* et *néoxanthine* sont utilisés dès leur sortie de la colonne de cellulose.

Dans les expériences de fractionnement du β-carotène, nous avons trouvé un lot de molécules nettement plus marquées que les autres (Deroche et Costes, 1966 *b*). Nous avons vérifié la pureté de cette fraction après chromatographie supplémentaire sur couche mince de gel de silice (Merck, moins de 0,08 mm, pour chromatographie) ; le mélange développant et saturant de la cuve est constitué d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle (85 : 15 v/v). On découpe la plaque en plusieurs zones (tache colorée, amont, aval) ; la poudre est aspirée dans une fiole de comptage et sa radioactivité déterminée.

2. Les chlorophylles

Elles sont particulièrement fragiles et altérables par les adsorbants forts (Bacon, 1966, Strain, Sherma et Granfoldo, 1967). aussi avons-nous procédé à des *chromatographies successives* sur colonne de cellulose et déterminé les radioactivités spécifiques sur des parties aliquotes. Nous avons obtenu une bonne reproductibilité des résultats avec les ^{14}C chlorophylles, indice d'une pureté satisfaisante (tableau V). Mais Dufour (1968) a constaté un abaissement de la radioactivité spécifique des ^{3}H chlorophylles. La régularité de la décroissance avec le nombre de chromatographies laisse supposer un échange du ^{3}H des chlorophylles avec l'absorbant ou avec les solvants.

Tableau V

Conservation de la radioactivité spécifique des chlorophylles marquées par le carbone — 14 au cours de chromatographies successives sur colonne de poudre de cellulose et après transformation en phéophytine.

Nombre de chromatographies successives	Radioactivités spécifiques (i.p.m./μg)	
	chlorophylle *a*	chlorophylle *b*
1	141	97
2	141	94
3	138	97
Transformation en phéophytine *a*		
	142	

De plus, dans le cas de la ^{14}C chlorophylle *a*, nous avons vérifié sa pureté d'une manière différente : transformée par acidification en ^{14}C-phéophytine *a*, elle conserve la même radioactivité spécifique (tableau V).

F. COMPTAGES DE RADIOACTIVITÉS

Toutes les déterminations ont été faites par scintillation liquide avec un compteur Tracerlab LSC 10 B. La décoloration des pigments par exposition à la lumière ultraviolette évite l'extinction de la scintillation (Deroche et Dufour, 1968). Afin de maintenir constante l'extinction due à l'éthanol, nous avons toujours conservé les mêmes proportions, en volume, d'éthanol et de solution scintillante (38 : 62) ; cette dernière contient 4 g de DPO et 0,1 g de POPOP par litre de toluène.

L'extinction due aux résidus de molécules de chlorophylles après décoloration a été appréciée par le comptage de prises d'essais contenant initialement 0,5 à 450 μg de ^{14}C-chlorophylle *a* ou 0,5 à 120 μg de ^{14}C-chlorophylle *b*. Au-dessus de 10 μg de pigment décoloré par fiole, il semble qu'il n'y ait pas d'extinction. Au-dessous, les résultats sont dispersés. En collaboration avec nous, Dufour (1968) a observé la même limite inférieure avec les chlorophylles tritiées. La figure 12 résume ces résultats ; les abscisses correspondent aux quantités comptées ; en ordonnées, nous avons porté le rapport ($\times 100$) entre la radioactivité

spécifique (i.p.m/µg) trouvée pour chaque mesure et une radioactivité spécifique moyenne établie avec tous les résultats comparables obtenus avec des prises d'essais supérieures à 10 µg de pigment initial.

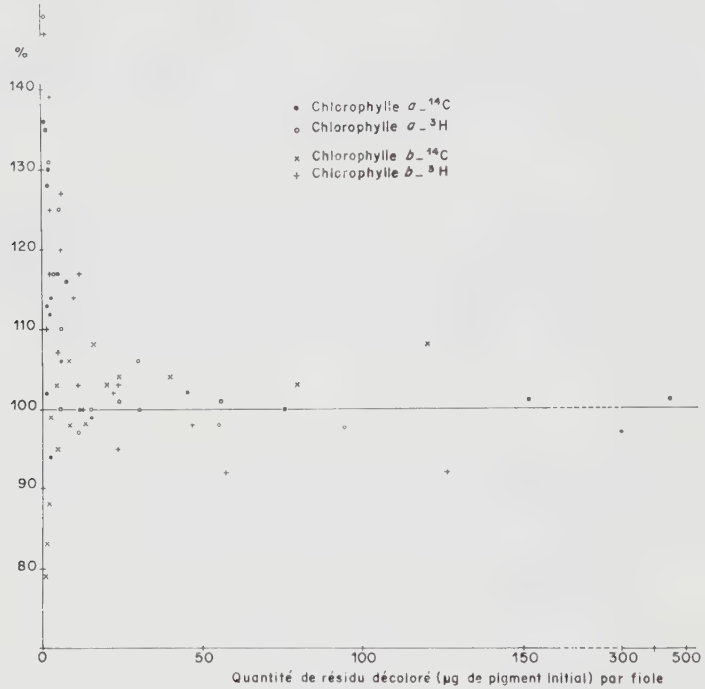


FIG. 12. — Etude de l'extinction de la scintillation par diverses quantités de résidus de chlorophylles *a* et *b* décolorées par exposition à la lumière ultraviolette. Les valeurs des radioactivités spécifiques sont semblables à ±10 % près quand les prises d'essais sont supérieures à 10 µg de pigment initial ; elles sont très dispersées pour les prises d'essais inférieures à cette limite.

En conséquence, nous avons toujours essayé de nous placer au-dessus de ce seuil (10 µg de chlorophylle ou 3 µg de caroténoïde par fiole) ; quand un lot de pigment fournissait, après purification, une quantité inférieure, nous lui comparions des quantités semblables dans une même série de comptages, afin de nous placer dans les mêmes limites d'erreur.

Une autre manière de contrôler la validité des radioactivités spécifiques des formes isolées au cours d'une extraction ménagée est fournie par un bon accord entre la valeur de la radioactivité spécifique moyenne et celle de la radioactivité spécifique témoin ; cette dernière est déterminée sur les pigments obtenus par extraction acétonique complète des pigments d'un échantillon végétal. La radioactivité spécifique moyenne est calculée : elle est égale à la somme des radioactivités incorporées dans les diverses fractions chlorophylliennes d'une extraction ménagée divisée par la quantité totale de pigment extraite. Si :

n, m, p... i sont les quantités de chlorophylles dans chacune des i fractions de l'extraction ménagée,

R_n, R_m, R_p... R_i, leurs radioactivités spécifiques respectives,

$$\text{R.S. moyenne} = \frac{n.R_n + m.R_m + p.R_p + \ldots + i.R_i}{n+m+p+\ldots+i}$$

IV. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES PIGMENTS LIPOSOLUBLES DES CHLOROPLASTES

L'extension de la notion d'hétérogénéité structurale et métabolique à l'ensemble des pigments liposolubles chloroplastiques constitue l'un de nos résultats originaux. Mais les chlorophylles et les caroténoïdes sont extraits des chloroplastes avec des lipides incolores. Selon KIRK et TILNEY-BASSETT (1967), la partie lipidique du chloroplaste le plus étudié chez les plantes supérieures, celui de l'Epinard, représente 30 à 36 % du poids de matière sèche.

L'application successive d'éther de pétrole, d'acétone, puis de chloroforme-méthanol (1 : 1) entraîne environ 40 % du poids des chloroplastes cryodesséchés (tableau VI) ; le total extrait ainsi est supérieur à la proportion de lipides, ce qui est normal puisque nous n'avons pas vérifié la proportion de lipides dans les différents extraits. Dans l'éther de pétrole où ces composés doivent être en quantité prédominante, une très faible proportion revient aux pigments (0,5 % du poids de chloroplastes lyophilisés ou de 3 à 9 % de la matière sèche extraite). Les lipides qui accompagnent les pigments sont donc abondants ; la majeure partie des lipides de cet extrait éthéropétrolique est constitué par des monogalactosyldiglycérides comme cela vient d'être établi dans notre laboratoire.

TABLEAU VI

Proportions de matière sèche et de pigments extraits de chloroplastes cryodesséchés par le passage successif d'éther de pétrole, d'acétone et de mélange chloroforme-méthanol (1 : 1).

N° de l'essai	Extractions successives de chloroplastes lyophilisés par :	Ether de Pétrole	Acétone	Chloroforme +méthanol (1 : 1)	Total
1	Poids de matière sèche extraite (% du poids de chloroplastes lyophilisés)	20,3	19,9	8,0	48,2
2		8,9	13,5	12,2	34,6
3		5,8	25,6	9,5	40,9
1	Poids de pigments (chlorophylles + caroténoïdes) extraits (% du poids de chloroplastes lyophilisés)	0,6	4,2	0,1	5,0
2		0,45	6,8	0,4	7,6
3		0,5	6,8	0,1	7,4
1	Poids de pigments extraits (% du poids de matière sèche extraite).	3,0	21,45	1,15	10,3
2		5,1	50,5	3,2	22,2
3		8,8	26,5	1,4	18,2

D'autre part, quand les feuilles ont absorbé du $^{14}CO_2$ par photosynthèse pendant 1 h, l'éther de pétrole entraîne 40 à 50 % de la radioactivité totale incorporée extraite par l'ensemble des solvants d'extraction ménagée. Donc, non seulement la quantité de substances solubles dans l'éther de pétrole est importante, mais leur marquage est intense. Une autre observation nous conduit à poursuivre l'élucidation de la composition de l'extrait éthéropétrolique ; après le lessivage des chloroplastes ou des feuilles lyophilisées par ce solvant qui est toujours le premier employé dans une extraction ménagée, la masse de chlorophylle moyennement liée devient soluble dans des mélanges dont la proportion d'éthanol est encore faible (fig. 9).

Les données bibliographiques sur les effets de l'éther de pétrole sur les chloroplastes ne sont pas très abondantes. Le lavage des lamelles chloroplastiques par l'hexane enlève un peu de chlorophylle et beaucoup de β-carotène sans changer beaucoup l'apparence des photos en microscopie électronique (PARK et PON, 1963).

Les préparations chloroplastiques lyophilisées conservent quelques temps leur capacité de réduire photochimiquement le dichlorophénolindophénol, aptitude qui disparaît après lavage par l'éther de pétrole ; elle peut reprendre après restitution d'une partie de l'extrait ; cette activité a été attribuée successivement au β-carotène (LYNCH et FRENCH, 1957), à la vitamine K (BISHOP, 1958), à la quinone Q 255 (BISHOP, 1959) ; il semble plutôt qu'il s'agisse de plastoquinone A dont RUMBERG et WITT (1964) suivent par spectrophotométrie différentielle la disparition dans les échantillons extraits par l'éther de pétrole. MAGREE, HENNINGER et CRANE (1966) retrouvent les plastoquinones A et C dans l'extrait obtenu d'abord par l'heptane, puis par l'éther de pétrole, alors que la structure des membranes chloroplastiques semble peu modifiée.

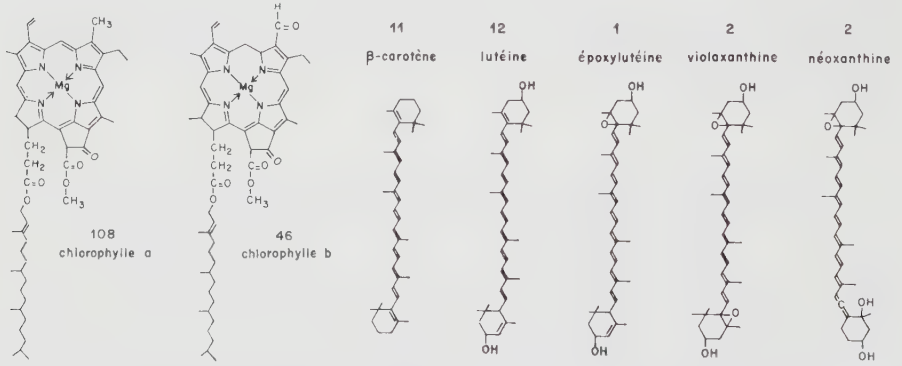


FIG. 13. — Composition pigmentaire des chloroplastes de Blé. Les quantités ont été rapportées à une mole d'époxylutéine.

Le travail réalisé ici concerne les substances « visibles » : caroténoïdes et chlorophylles (fig. 13). Nous avons rassemblé les résultats en trois sous-chapitres, chacun passant en revue l'hétérogénéité structurale et métabolique d'un pigment ou d'un groupe de pigments.

— Le β-carotène a été traité à part car sa nature d'hydrocarbure sans substituant polaire ne semble pas le destiner à présenter la plus grande hétérogénéité. De plus, on sait qu'il occupe une place à part dans le métabolisme caroténoïdien (COSTES, 1965).

— Les xanthophylles seront étudiées ensuite ; nos résultats actuels concernent surtout les deux xanthophylles les plus importantes en quantité dans les feuilles vertes : la lutéine (3, 3′ -dihydroxy-α-carotène), la violaxanthine (3, 3′-dihydroxy-5, 6, 5′, 6′-diépoxy-β-carotène).

Les deux autres xanthophylles foliaires, époxylutéine et néoxanthine sont extraites en quantités souvent trop faibles pour permettre de mener à leur terme toutes les opérations jusqu'au comptage de radioactivité.

— Enfin, la majeure partie de notre travail a été consacrée aux chlorophylles, particulièrement à la chlorophylle *a*. La chlorophylle *b*, compagne toujours présente de la précédente dans les feuilles, a été dosée et son hétérogénéité établie ; mais, lors des marquages par le gaz carbonique radioactif, nous avons souvent éprouvé des difficultés pour la purifier.

A. HÉTÉROGÉNÉITÉ STRUCTURALE ET MÉTABOLIQUE DU β-CAROTÈNE

Nous avons étudié cette hétérogénéité avec la méthode mise au point pour les chlorophylles ; la croissance régulière de la polarité des mélanges d'extraction a été complétée par l'utilisation du facteur température. Cependant les résultats récents de Ji, Hess et Benson (1968) et Ji et Benson (1968) sur la « protéine-carotène », obtenue après le traitement de chloroplastes par de l'acétone aqueuse de moins en moins riche en eau, permettent d'envisager l'étude de l'hétérogénéité du β-carotène par l'emploi de solvants de moins en moins polaires.

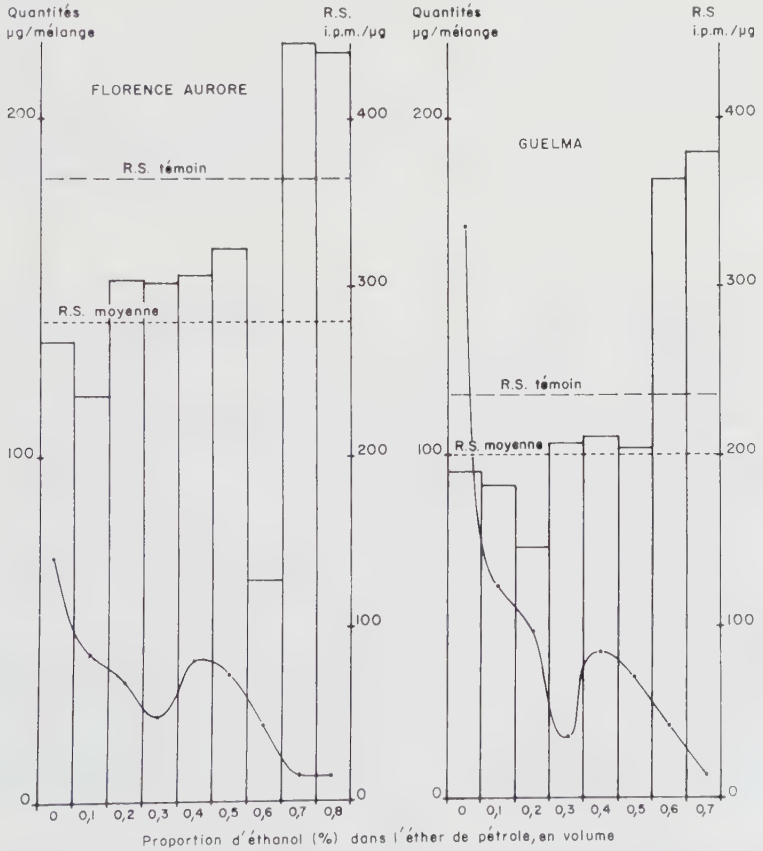


Fig. 14. — Courbes d'extraction ménagée et diagramme des radioactivités spécifiques du β-carotène de feuilles fraîches de deux variétés de Blé. Le poids de matière fraîche est de 10 g environ (*Florence Aurore :* 10,265 g ; *Guelma :* 10,182 g).

L'éther de pétrole, bon solvant des lipides neutres, ne fait pas passer la totalité du β-carotène en solution ; ce fait est compréhensible lorsqu'il s'agit de *feuilles fraîches* dans lesquelles on peut imaginer une opposition de l'eau à la pénétration de l'éther de pétrole jusqu'aux sites de localisation des pigments dans les plastes. On obtient des courbes d'extraction ménagée (fig. 14 et 17) qui permettent de distinguer 3 formes d'après les forces de liaison : peu liée, moyennement liée et très liée. Les courbes de la figure 14 font apparaître un fractionnement du β-carotène fondé sur les radioactivités spécifiques des lots de molécules isolées ; ces groupes sont à rapprocher de la subdivision en 3 formes que nous venons de distinguer.

Quand on a enlevé pratiquement toute l'eau du matériel végétal par *lyophilisation,* le β-carotène passe rapidement en solution dans un hydrocarbure (fig. 17) ; on serait tenté de croire qu'il n'en reste plus car l'éther de pétrole seul a enlevé 97 à 99 % du pigment. La superposition des diagrammes de radioactivités spécifiques aux courbes d'extraction ménagée (DEROCHE et COSTES, 1966 *b*) montre que la faible quantité résiduelle de β-carotène très liée aux structures à un renouvellement plus intense que la masse mise facilement en solution. Nous avons vérifié avec soin cet enrichissement en ^{14}C par purifi-

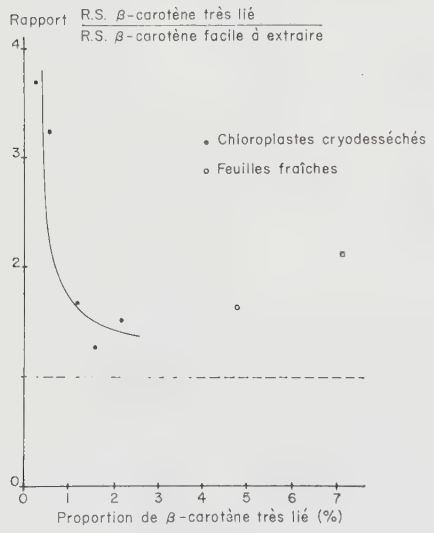


FIG. 15

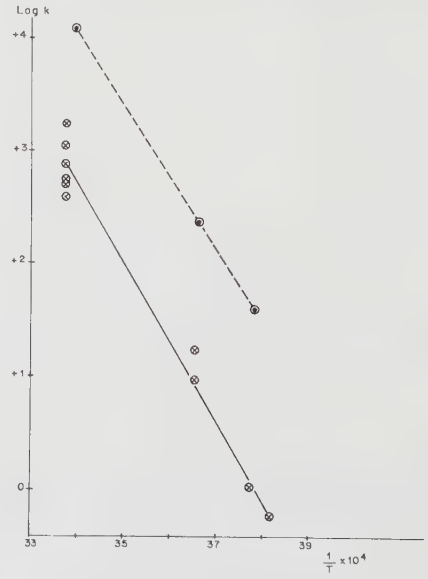


FIG. 16

FIG. 15. — Relation entre :

— *le rapport des radioactivités spécifiques* des fractions de β-carotène très lié et de β-carotène facile à extraire,

— *et le pourcentage de la fraction très liée* qui n'est pas mise en solution quand l'éther de pétrole traverse des chloroplastes cryodesséchés.

Dans le cas de feuilles fraîches, il restait encore 2 % de β-carotène dont nous ne connaissons pas les radioactivités spécifiques.

FIG. 16. — Variation du logarithme népérien de la constante de dissociation k du complexe « site macromoléculaire - β-carotène » *en fonction de l'inverse de la température* à laquelle se produit la dissociation. Les deux droites correspondent à deux séries d'essais sur des chloroplastes cryodesséchés de la variété *Florence Aurore.*

cation supplémentaire sur couche mince (cf. chapitre III). D'autre part, il semble que cette fraction métabolique soit celle de molécules nouvellement formées ; la différence de radioactivité spécifique semble devenir plus importante quand la proportion de cette forme fortement liée est de plus en plus petite, comme si on l'avait mieux sélectionnée (fig. 15).

Au cours des extractions ménagées de feuilles fraîches ou de chloroplastes cryodesséchés, on a trouvé quelques groupes de molécules de β-carotène moins marquées que les autres ; elles représentent 7 à 18 % du β-carotène total et leur radioactivité spécifique est plus faible que la moyenne ($\times 0{,}75$ ou 0,50).

Afin de fractionner la masse de β-carotène extractible par l'éther de pétrole à la température ordinaire, nous avons refroidi les solvants et l'ensemble du dispositif d'extraction ; nous avons observé une amorce de paliers pour les courbes d'épuisement aux températures essayées (fig. 8). Nous supposons que nous avons atteint un équilibre de dissociation d'un complexe PX entre un site macromoléculaire P (phase solide) et une molécule de β-carotène X (qui passe en phase liquide), avec une constante d'équilibre, k :

$$PX \rightleftharpoons P + X$$

si on appelle :

(PX), la concentration molaire de tous les sites occupés à l'équilibre,

(P) , la concentration molaire en sites libres,

(X) , la concentration molaire en pigment libre extrait,

conformément à notre hypothèse préliminaire pour chaque température d'extraction, à l'équilibre, (P) = (X) et :

$$k = \frac{(X)^2}{1-(X)}$$

Dans la figure 16, on a porté Log k en fonction de l'inverse de la température absolue 1/T, pour tous les essais que nous avons réalisés. Les points se placent sur des droites dont les coefficients angulaires permettent de calculer l'enthalpie de liaison par site molaire d'association. ΔH_o, selon la loi de VANT'HOFF.

Avec les préparations chloroplastiques de la variété *Florence Aurore,* on a obtenu des valeurs de ΔH_o qui se situent entre 13 et 16 kilocalories par site molaire. Ceci correspondrait à 2 ou 3 liaisons hydrogènes ou π-métalliques par molécule de β-carotène de la masse extractible par l'éther de pétrole (DEROCHE et COSTES, 1968). Mais cet extrait éthéropétrolique est constitué en majeure partie de lipides et on peut penser qu'il y a entre le β-carotène, les chaînes d'acides gras et des résidus d'acides aminés surtout, des associations hydrophobes, conclues de façon que la surface de contact entre ces composés et l'eau soit la plus petite possible. Or les forces mises en jeu dans ce cas sont faibles (0,002 à 0,5 kcal/mole). Les valeurs mesurées de l'enthalpie molaire de liaison pourraient correspondre à un grand nombre d'associations hydrophobes.

B. HÉTÉROGÉNÉITÉ STRUCTURALE ET MÉTABOLIQUE DES XANTHOPHYLLES

Les xanthophylles semblent aptes à former des liens plus variés que ceux du β-carotène avec les lipoprotéines chloroplastiques, à cause de l'existence d'hydroxyles et d'époxydes dans leurs molécules.

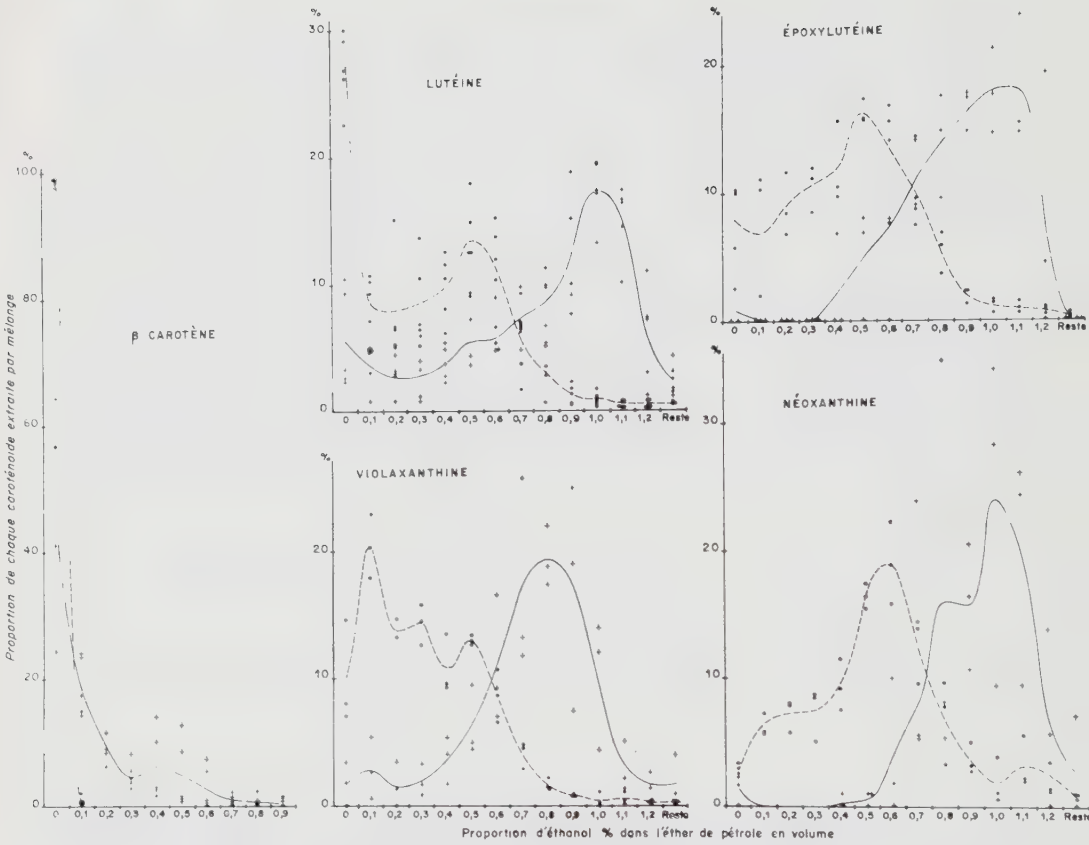


FIG. 17. — Courbes d'extraction ménagée des caroténoïdes de Blé à partir de feuilles fraîches (———) et de chloroplastes cryodesséchés (— — — —). Les moyennes portent sur 5 essais pour le β-carotène et pour la lutéine, sur 3 essais pour l'époxylutéine, la violaxanthine et la néoxanthine. En abscisses, la polarité est indiquée par le % d'éthanol dans l'éther de pétrole ; en ordonnées, la proportion de chaque pigment est donnée en % du total.

Les courbes de la figure 17 montrent que toutes les xanthophylles sont hétérogènes dans leurs liaisons aux structures, dans les feuilles vertes comme dans les chloroplastes cryodesséchés. La technique d'extraction ménagée est apte à rendre compte de l'importance des forces de liaisons des divers pigments au sein des chloroplastes ; après le départ de l'eau par cryodessiccation, les xanthophylles passent en solution dans l'éther de pétrole plus facilement qu'à partir des feuilles fraîches ; la proportion d'une xanthophylle extraite par l'éther de pétrole est d'autant plus grande que le nombre de groupes hydroxyles et époxydes est plus petit ; de plus, l'existence de ces groupements polaires nécessite l'emploi de mélanges extracteurs enrichis en éthanol pour mettre les xanthophylles en solution. La lutéine qui possède 2-OH seulement est la plus facile à extraire et la plus difficile est la néoxanthine (3-OH, un pont époxyde) ; cependant la violaxanthine de

structure β qui a 2-OH et 2 ponts époxydes semble plus facile à extraire que l'époxylutéine, de structure α, qui a aussi 2-OH mais un seul groupe époxyde (fig. 13).

Nous avons montré également *l'hétérogénéité métabolique* des xanthophylles (COSTES et DEROCHE, 1965). Le marquage des pigments par le carbone-14 suivi de fractionnement par extraction ménagée montre des différences importantes entre les radioactivités spécifiques des fractions isolées (fig. 18 et 19, tableau VII). On peut tenter de regrouper les molécules de lutéine en 3 formes.

Formes de lutéine	Force de liaison	Renouvellement
I	faible	très rapide
II	moyenne	lent
III	forte	rapide

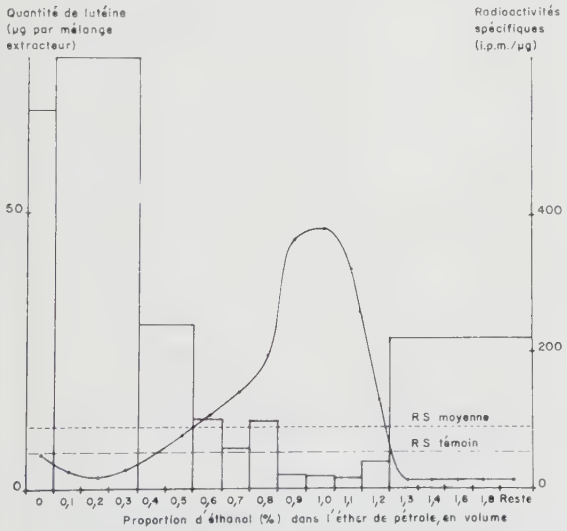


FIG. 18

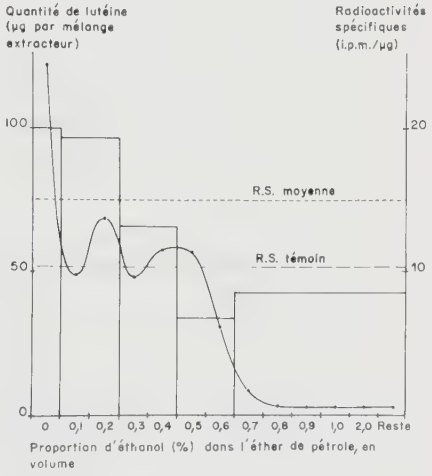


FIG. 19

FIG. 18. — Courbe d'extraction ménagée et diagramme des radioactivités spécifiques de la lutéine de feuilles fraîches de Blé, variété *Florence Aurore* (poids de matière fraîche extraite : 10,265 g).

FIG. 19. — Courbe d'extraction ménagée et diagramme des radioactivités spécifiques de la lutéine de chloroplastes cryodesséchés de Blé, variété *Florence Aurore* (poids de préparation chloroplastique lyophilisée extraite : 156,5 mg).

Les données que nous possédons sur la violaxanthine sont moins nombreuses parce que les quantités isolées sont souvent faibles. Cependant, il faut noter le renouvellement très intense de la violaxanthine faiblement liée. Le tableau VII nous indique également le marquage relatif des diverses fractions de caroténoïdes

d'un même échantillon végétal. Ceci nous permet de conclure à l'hétérogénéité structurale et métabolique de tous les caroténoïdes.

TABLEAU VII

Quantités (μg) *et radioactivités spécifiques* (i.p.m./μg) *des différentes fractions de caroténoïdes obtenus par extraction ménagée à partir de 10 g de feuilles fraîches de Blé* (Guelma) *ayant incorporé* $^{14}CO_2$ *par photosynthèse pendant une heure.*

% d'éthanol dans l'éther de pétrole	β-carotène		lutéine		époxylutéine		violaxanthine		néoxanthine	
	μg	R.S.	μg	R.S.	μg	R.S.	μg	R.S.	μg	R.S.
0	167,0	189	11,7	252			2,6			
0,1	61,3	181								
0,2	48,4	145	10,9	214			1,1			
0,3	16,6	206	4,2				1,3			
0,4	41,4	210	19,4	22	1,3	247	4,0	634	0,3	
0,5	35,2	203	25,8	54	3,3		7,2		0,8	
0,6	23,0	363	32,5	20	4,3	247	13,5	110		
0,7	6,5	379	38,1	25	5,1		19,6	33	12,5	17
0,8	4,0		39,8	12	4,9		14,2	49	18,3	191
0,9	3,6		53,5	12	3,9	137	5,7	69	10,7	11
1,0			60,8	15	6,2		3,3		7,7	17
1,1			35,8	59	4,3		1,7		2,2	
reste			8,6	111			0,6			

C. HÉTÉROGÉNÉITÉ STRUCTURALE ET MÉTABOLIQUE DES CHLOROPHYLLES

Les deux chlorophylles *a* et *b* sont hétérogènes dans les forces qui les lient aux structures chloroplastiques et dans leur renouvellement. Ce résultat repose sur l'ensemble de nos essais d'extraction ménagée et de répartition de la radioactivité dans les feuilles vertes et dans les feuilles étiolées en voie de verdissement (tableau VIII et IX).

1. Matériel végétal vert

1.1. Hétérogénéité de liaison :

La plus grande partie de notre travail a été réalisée sur les parties aériennes de Blé âgé de 13 jours. A partir de matériel végétal vert employé sous forme de feuilles fraîches, de préparations chloroplastiques lyophilisées ou de feuilles cryodesséchées (chapitre II), on peut toujours définir des formes peu liées, moyennement liées et très liées (fig. 9). Quand l'eau est retirée de la plante par cryodessiccation,

la proportion de chlorophylle facile à extraire reste inférieure à 10 % alors que nous avons vu qu'un traitement par la chaleur à la fois déshydratant et dénaturant rend soluble dans l'éther de pétrole la moitié de la chlorophylle totale (tableau I). La lyophilisation rend plus accessible la forme de pigment moyennement liée extractible par des mélanges d'éther de pétrole et d'éthanol ; elle ne semble pas intervenir sur la solubilité de la fraction de pigments très liée aux structures chloroplastiques.

Un autre argument en faveur de l'hétérogénéité des chlorophylles dans leurs liaisons aux lipoprotéines réside dans la forme des courbes d'épuisement de feuilles fraîches ou de chloroplastes lyophilisés par les divers mélanges extracteurs (fig. 7). La superposition des paliers dans le sens des polarités croissantes confirme l'existence de groupes de molécules de plus en plus liées. L'emploi des solvants polaires, autres que l'éthanol ou l'acétone, permettra peut-être de faire de la technique d'extraction ménagée une méthode de mesure des énergies de liaison des pigments aux structures chloroplastiques.

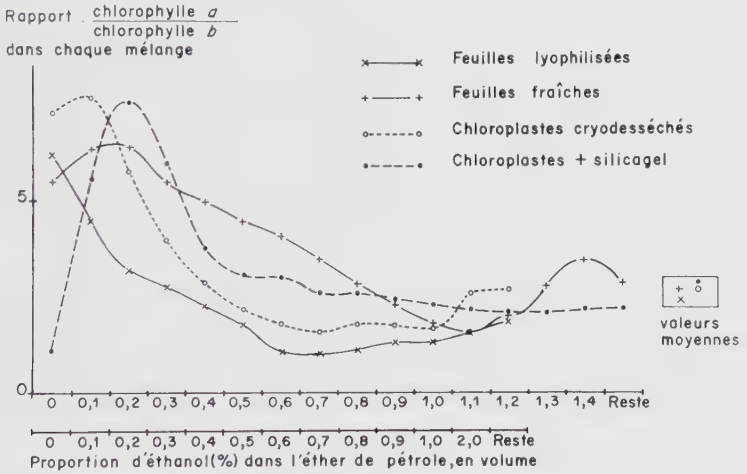


FIG. 20. — Comparaison des quantités relatives de chlorophylles *a* et *b* dans les divers mélanges extracteurs utilisés pour les extractions ménagées de feuilles et de préparations chloroplastiques. Les moyennes sont faites sur le même nombre de répétitions que dans la figure 9 (feuilles lyophilisées : 7, feuilles fraîches : 17, chloroplastes cryodesséchés : 17, chloroplastes + silicagel : 15).

D'après les pourcentages extractibles dans un solvant de polarité donnée, on trouve toujours une liaison plus forte de la chlorophylle *b* par rapport à la chlorophylle *a*. Dans la plupart des cas, le rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* diminue au cours de l'extraction ménagée (fig. 20). Mais un rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* plus élevé dans les mélanges de faible polarité que dans un extrait global des pigments n'est pas une preuve de l'isolement du système I de la photosynthèse, argument que l'on trouve parfois dans la bibliographie. On ne doit pas oublier que la chlorophylle *a* est plus soluble que la chlorophylle *b* dans l'éther de pétrole.

1.2. **Hétérogénéité métabolique**

Elle a été mise en évidence par SHLYK et ses collaborateurs à la suite de photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$ dans l'atmosphère ou de ^{14}C-bicarbonate dans le milieu de culture. Nous avons également enrichi en $^{14}CO_2$ pendant 1 h l'atmosphère dans laquelle croissent nos jeunes plants de Blé ; la radioactivité incorporée dans l'ensemble des molécules de chlorophylles *a* et *b* est toujours faible ; elle atteint au maximum 1 % de la radioactivité totale incorporée par photosynthèse dans les parties vertes. Nous avons toujours trouvé que les molécules de chlorophylles faciles à extraire étaient plus riches en ^{14}C que les autres (tableau VIII).

Nous n'avons pas séparé la molécule de chlorophylle en phytol et noyau tétrapyrrolique puisque SHLYK et NIKOLAEVA (1963 *b*) avaient retrouvé la même répartition de la radioactivité dans les parties phytolique, méthoxyle et chlorophyllinique de leurs formes I et II extraites respectivement par le mélange éther de pétrole + éthanol (99,3 : 0,7, v/v) et par l'acétone.

Nous avons essayé un précurseur plus proche que le CO_2 du noyau tétrapyrrolique dans la biosynthèse chlorophyllienne : *le* 4-^{14}C *δ-aminolévulinate de potassium* dans les limbes verts de Blé de 7 jours et nous l'avons comparé à une incorporation classique d'une heure de photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$ (tableau VIII). Quoique anormalement abondante dans cette expérience, la chlorophylle extractible par l'éther de pétrole a incorporé plus de précurseur par molécule que la masse chlorophyllienne plus liée. Parmi les molécules très liées, extractibles par les solvants les plus polaires, nous avons trouvé une répartition différente selon que le marquage provient du $^{14}CO_2$ ou du ^{14}C δ-aminolévulinate (tableau VIII).

Nos résultats les plus originaux sont fournis par incorporation d'un précurseur aussi lointain que le gaz carbonique : *l'eau tritiée*. Comme avec le carbone-14, la chlorophylle peu liée est plus marquée que la masse moyennement liée. De plus, la forme de chlorophylle *a* ou *b* la plus liée aux structures chloroplastiques a été renouvelée très rapidement (tableau VIII).

1.3. **Formes de chlorophylles**

Pour simplifier, on peut dire qu'il y a, dans les feuilles vertes, au *moins* 3 *formes de chlorophylle a* et 3 *formes de chlorophylle b* que l'on peut définir ainsi :

1.3.1. *La forme I* est facile à extraire ; l'éther de pétrole suffit à l'enlever du matériel lyophilisé ; dans les extractions de feuilles fraîches, on peut y adjoindre 0,2 à 0,3 % d'éthanol. Dans l'extrait éthéropétrolique, la chlorophylle *a* est toujours plus abondante (en %) que la chlorophylle *b* qui est cependant toujours présente. L'activité métabolique de cette forme, représentée par l'enrichissement en traceur, est toujours intense ; elle est constituée vraisemblablement des molécules néoformées. Nous discuterons dans le chapitre V les caractères de cette forme I et les critères de sélection de ces molécules ; nous verrons qu'elle correspond à moins de 5 % de la chlorophylle totale.

1.3.2. *La forme II* se détache des structures chloroplastiques quand on les traite par des mélanges plus polaires d'éther de pétrole et d'éthanol (jusqu'à 2 %) ; en masse, elle est très importante (80 à 90 % du total) mais son renouvellement est lent.

TABLEAU VIII

Pourcentages et radioactivités spécifiques (i.p.m. µg) *des différentes fractions de chlorophylles peu liées* (I), *moyennement liées* (II) *et très liées* (III) *aux structures, après incorporation de divers précurseurs radioactifs dans du matériel vert.*

Le Blé âgé de 7 jours possède une seule feuille ; âgé de 10, 13 et 16 jours, deux feuilles numérotées selon leur ordre d'apparition. Quand l'indication d'âge ne précise pas le n° de la feuille (13) on a opéré sur l'ensemble des deux limbes.

Précurseur	Matériel végétal extrait	Age (jours)	CHLOROPHYLLE *a* I	CHLOROPHYLLE *a* II	CHLOROPHYLLE *a* III	CHLOROPHYLLE *b* I	CHLOROPHYLLE *b* II	CHLOROPHYLLE *b* III
	Feuilles fraîches	12	25 % *127*	28 % *97*	45 % *100*	14 % *276*	32 % *74*	51 % *116*
		13	4 % *179*	82 % *87*	14 %			
		13	7 % *121*	80 % *76*	5 % *45*			
	Chloroplastes cryodesséchés	13	16 % *21*	39 % *16*	45 % *8*			
		13	10 % *28*	38 % *16*	52 % *10*			
$^{14}CO_2$	Feuilles lyophilisées	7	0,9 % *158,8*	79 % *5,1*	20,1 % *3,7*			
		7	1,2 % *34,0*	93,3 % *5,4*	5,5 % *4,3*			
		10 l. n° 1	4,1 % *9,1*	92,9 % *0,7*	3,0 % *0,9*			
		13 l. n° 1	9,1 % *1,6*	89,8 % *1,4*	1,1 % *3,7*			
		16 l. n° 1	2,9 % *132,8*	71,1 % *2,3*	26,0 % *2,0*			
		13 l. n° 2	0,9 % *409,6*	84,6 % *6,6*	14,6 % *5,4*			
		16 l. n° 2	2,4 % *97,3*	71,4 % *9,6*	26,2 % *3,9*			
		7	30,5 % *3,0*	60,5 % *1,5*	8,5 % *3,6*	0,5 % *1,6*		
4 ^{14}C-δ-aminolévulinate		7	24,0 % *202*	71,5 % *141*	4,0 % *83*	0,5 % *158*	21 % *85*	2 % *24*	76 % *14*	1 % *31*
	Feuilles fraîches	13	10 % *4,5*	75 % *0,1*	15 % *4,0*	6 % *4,5*	80 % *0,2*	14 % 5,1
		13	11 % *1,3*	81 % *0,1*	8 % *2,9*	6 % *6,9*	85 % *0,8*	9 % *4,2*
$^{3}H_2O$	Feuilles lyophilisées	13		35,6 % *0,3*	3,4 % *1,1*			
	Chloroplastes isolés	13	11,5 % *0,4*	82,2 % *0,2*				

1.3.3. *La forme III* (5 à 10 % du total) est difficile à extraire ; un solvant très polaire comme l'acétone est nécessaire pour l'arracher des sites chloroplastiques où elle se loge. Son squelette carboné est métabolisé à une vitesse quelquefois plus grande, quelquefois plus lente que celui de la masse précédente, mais ses atomes d'hydrogène sont renouvelés très rapidement.

On doit remarquer que l'on n'a pas toujours des frontières nettes entre les groupes de molécules ainsi définis et que l'on obtient souvent une érosion progressive des différents compartiments de pigments dans les chloroplastes.

2. Feuilles de Blé étiolées en verdissement

La chlorophylle s'installe relativement vite dans des limbes de Blé cultivés au préalable pendant 7 jours à l'obscurité et exposés à la lumière continue sous un éclairement de 7 000 lux (fig. 21). Après 36 h d'éclairement, les limbes qui sont restés sur les pieds de Blé contiennent 11 mg de chlorophylle $a + b$ par g de matière lyophilisée alors que les limbes verts de 7 jours en contiennent normalement 16 mg/g. Si l'on expose à la lumière des limbes étiolés coupés au niveau de la ligule, le démarrage de la synthèse chlorophyllienne est plus rapide, surtout si du δ-aminolévulinate de potassium a été fourni juste avant l'éclairement. Sisler et Klein (1963) signalaient l'absence de période de latence dans les feuilles de Haricot étiolées pré-incubées dans de l'acide δ-aminolévulinique pendant une nuit. Les quantités que nous avons apportées sont 30 fois plus faibles (2.10^{-6} moles aspirées sous vide pendant 10 mn dans 15 g de limbes) ; l'effet accélérateur du δ-aminolévulinate de potassium se maintient pendant 8 h dans notre matériel végétal. Mais après 24 h de lumière, nos limbes coupés ne verdissent plus aussi vite que ceux qui sont nourris par les racines (fig. 21).

Le fractionnement des chlorophylles au cours de leur mise en place a été essayé par Shlyk et Nikolaeva (1963 *b*). Pour obtenir assez de pigment, les feuilles d'Orge étiolées avaient subi 10 h de pré-éclairement, puis 30 mn d'absorption de $^{14}CO_2$ et le verdissement se poursuivait. Dans ces conditions, les auteurs trouvent une différence entre les radioactivités spécifiques des chlorophylles *a* ou *b* facilement (I) ou difficilement (II) extraites, 1 h après l'incorporation ; puis après 13 et 24 h, les vitesses de renouvellement sont semblables pour les formes I et II. Il faut se souvenir que Shlyk et Nikolaeva extraient des feuilles fraîches avec un premier mélange d'éther de pétrole et de 0,7 % d'éthanol (forme I), puis avec l'acétone (forme II).

2.1. Variations de pourcentages extractibles en fonction du temps d'éclairement

Nous comptons le temps d'éclairement depuis la mise à la lumière initiale des limbes étiolés ; les limbes coupés sont préparés sous une lumière verte faible en retirant soigneusement les coléoptiles. Après les durées désirées d'exposition à la lumière, les limbes sont cryodesséchés à l'obscurité. C'est sur ce matériel finement réduit en poudre, homogénéisé dans du sable que nous appliquons les solvants de l'extraction ménagée en percolation sur colonne. Nous avons dosé les chlorophylles *a* et *b* dans les effluents et exprimé les proportions extraites par les divers solvants en % de la quantité totale contenue dans les limbes ; comme les chlorophylles *a* et *b* se comportent de la même manière, les résultats sont donnés en fonction de leur somme (fig. 22).

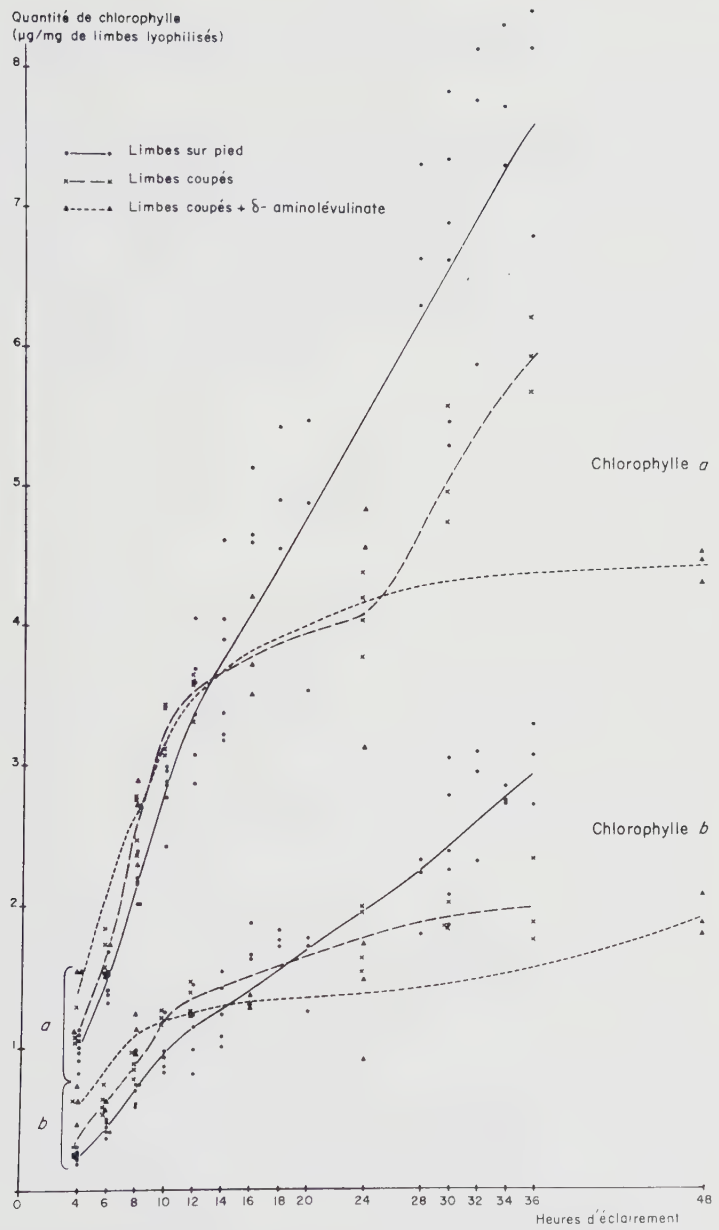


FIG. 21. — Accumulation de la chlorophylle *a* et de la chlorophylle *b* dans des limbes étiolés placés à la lumière au temps 0.

Malgré les différences prévisibles entre un étioplaste et un chloroplaste, nous avons retrouvé, pour chacune des chlorophylles :

— une forme I, facile à extraire par l'éther de pétrole ;

— une forme II, extractible par le passage successif d'éther de pétrole enrichi en éthanol (de 0,1 à 2 %) ;

— une forme III qui n'est solubilisée que par un solvant très polaire comme l'acétone. Signalons tout de suite que, dans son élution par l'acétone aqueuse (20 % d'eau), cette forme III est suivie d'une quantité importante de pigments verts hydrosolubles ; nous les avons éliminés par partage immédiat de l'effluent entre une épiphase éthéropétrolique contenant les chlorophylles et une hypophase acétonoaqueuse où se trouvent les chlorophyllides et les autres substances hydrosolubles. Il est normal de trouver des précurseurs de la chlorophylle en quantité abondante dans ce matériel en voie de verdissement. En plus de leur solubilité, nous avons vérifié qu'il s'agit bien de chlorophyllides par l'établissement de leur spectre dans l'éther éthylique.

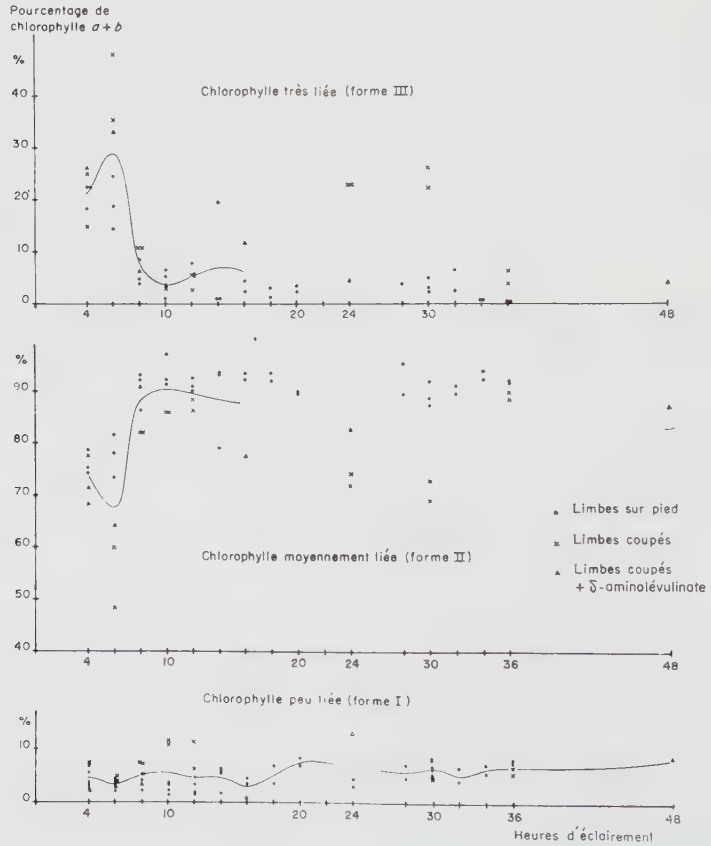


FIG. 22. — Evolution des pourcentages de chlorophylle (a + b) différemment liée aux structures au cours du verdissement de limbes étiolés ; la lumière est donnée à partir du temps 0.

La proportion de forme I reste inférieure à 10 %. Dans les divers essais nous avons souvent trouvé une valeur minimale qui semble se produire à 6 h d'éclairement.

La proportion de forme II augmente nettement au cours des 10 premières heures de lumière pour rester stable ensuite.

La proportion de forme III au contraire est bien plus élevée après 4 à 6 h d'exposition à la lumière que lors du fractionnement des feuilles vertes ; elle diminue ensuite de manière complémentaire à celle de la forme II.

Après 24 h de survie, les limbes coupés ont un comportement anormal, comme le montre la courbe de verdissement (fig. 21).

On observe aussi des variations dans les teneurs en *caroténoïdes* au cours de l'éclairement ; synthèse très rapide de β-carotène, beaucoup moins importante

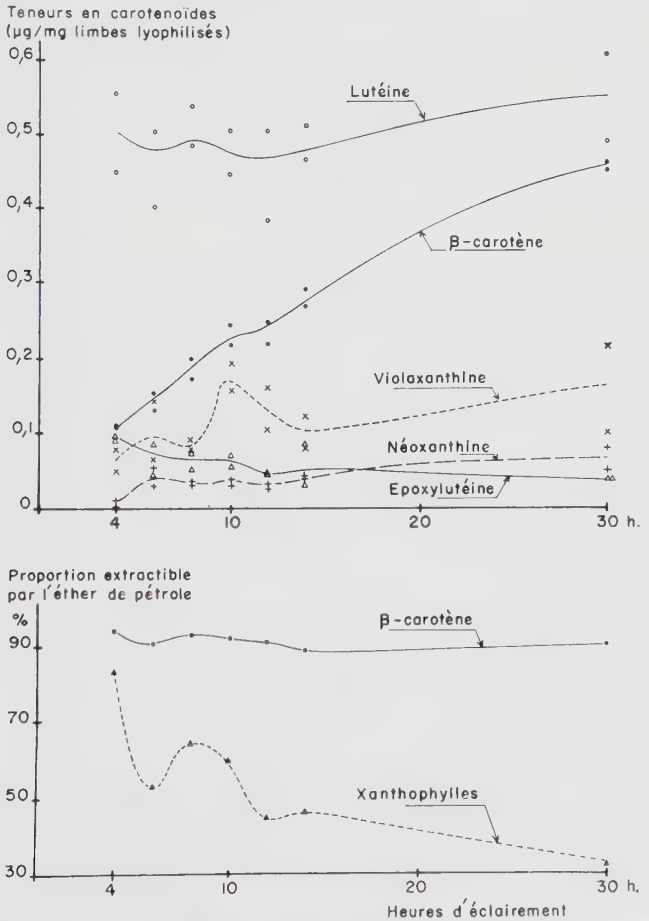


FIG. 23. — Variations des teneurs en caroténoïdes et évolution des pourcentages extractibles par l'éther de pétrole au cours du verdissement de limbes étiolés, exposés sur pied à la lumière.
(●) β-carotène, (o) lutéine, (Δ) époxylutéine, (×) violaxanthine, (+) néoxanthine, (▲) somme des xanthophylles.

de violaxanthine et de néoxanthine, légère diminution des teneurs en lutéine et en époxylutéine (fig. 23). Quant au pourcentage extractible par l'éther de pétrole, il reste quasi constant pour le β-carotène et il diminue considérablement pour les xanthophylles ; entre 4 et 30 h d'exposition à la lumière, la proportion de lutéine facile à extraire passe de 90 à 40 %, celle de violaxanthine de 95 à 25 %, celle d'époxylutéine de 90 à 15 % ; la néoxanthine extractible par l'éther de pétrole oscille de 15 à 35 %. On ne connaît pas bien la localisation des caroténoïdes dans les étioplastes ; dans les feuilles étiolées, il existe peut-être des globules de caroténoïdes libres, facilement accessibles aux solvants.

2.2. Marquage relatif des différentes formes en présence de 4-^{14}C δ-aminolévulinate de potassium

A partir de ce précurseur l'enrichissement des chlorophylles en carbone-14 est très rapide (tableau IX). En période de synthèse rapide et en présence d'un précurseur proche du noyau tétrapyrrolique, on retrouve 50 à 65 % de la radioactivité incorporée totale dans les chlorophylles.

Le tableau IX fait apparaître pour chaque heure de prélèvement, des différences entre les vitesses de renouvellement des fractions estimées par les radioactivités spécifiques mais elles sont difficiles à interpréter. Après un éclairement de longue durée, les molécules les plus difficiles à extraire sont moins

Tableau IX

Quantités (μg/mg de limbe cryodesséché) *et radioactivités spécifiques* (i.p.m./μg de pigment) *des chlorophylles* a *et* b *dans les divers compartiments obtenus par extractions ménagées et par extractions témoins de limbes étiolés placés à la lumière pendant les différentes durées d'éclairement indiquées.* Le 4-^{14}C δ-aminolévulinate de potassium est fourni au temps 0. (E.P. = éther de pétrole)

		μg /mg	i.p.m. /μg	μg /mg	i.p.m. /μg	μg /mg	i.p.m. /μg	μg /mg	i.p.m. /μg	μg /mg	i.p.m. /μg	μg /mg	i.p.m. /μg
Solvants													
E.P.	Chlorophylle *a*	31	2 464	60	1 877	86	3 670	28	3 412	478	2 260	442	2 128
E.P. +0,1 %		239	2 642	341	2 264	641	3 208	481	3 434	879	2 161	830	2 060
E.P. +0,5 %		328	2 695			926	2 994	1 313	3 427	916	2 385	1 679	2 020
E.P. +1,0 %		123	2 173	436	2 350	339	2 343	882	2 644	552	1 928	941	1 401
E.P. +2,0 %		118	1 925	359	2 616	142	1 841	411	1 693	167	1 629	264	1 138
Acétone		271	1 716	530	2 920	144	1 227	388	1 147	127	1 505	165	864
Somme ou (moyenne)		1 110	(2 298)	1 727	(2 545)	2 279	(2 800)	3 504	(2 775)	3 118	(2 146)	4 321	(1 806)
témoin 1		1 526	2 402	1 514	1 557	2 715	2 737	3 715	2 986	4 565	2 315	4 542	3 047
témoin 2		1 532	2 232			2 887	2 166	4 213	1 232	4 837	1 851	4 480	2 083
Solvants													
E.P.	Chlorophylle *b*	5		5	1 483	15		6		44		94	1 811
E.P. +0,1 %		61	1 956	73	2 176	179	1 093	90	2 300	212	1 906	267	2 156
E.P. +0,5 %		137	2 366			425	2 328	415	3 202	342	2 269	635	2 052
E.P. +1,0 %		63	1 890	136	2 205	215	1 988	422	2 573	161	1 923	565	1 481
E.P. +2,0 %		56	1 888	155	2 325	74	1 704	195	1 815	83	1 429	153	896
Acétone		140	1 647	246	2 980	57	1 449	176	1 191	53		87	738
Somme ou (moyenne)		463		616	(2 524)	964		1 304		895		1 800	(1 714)
témoin 1		732	2 208	555	1 863	1 124	1 507	1 362	2 792	1 467	1 764	2 081	2 676
témoin 2		615	1 956			1 228	1 719	1 265	1 111	1 715	2 011	1 878	1 845
Durées éclairement		4 heures		6 heures		8 heures		16 heures		24 heures		48 heures	

marquées que celles obtenues par extraction témoin. Après 16 h, les différences entre les radioactivités spécifiques des deux échantillons témoins montrent la difficulté que l'on a à assurer un enrichissement homogène en précurseur. Les points 4 h et 8 h d'éclairement nous ont fourni une répartition de la radioactivité semblable à celle obtenue sur des feuilles vertes : enrichissement accéléré de la chlorophylle facile à extraire, ralenti de la forme très liée aux structures. Mais après 6 h d'éclairement, nous avons obtenu un schéma inverse.

Il est possible qu'après 6 h d'éclairement, il se produise un phénomène important du processus de verdissement. TOLBERT et GAILEY (1955) montrent que la fixation de $^{14}CO_2$ qui est faible au début de l'éclairement de Blé étiolé devient notable et augmente rapidement après 5 h environ d'exposition à la lumière ; la variété de Blé utilisée est différente de celle que nous avons employée mais la durée de croissance des jeunes plants à l'obscurité est la même : 7 jours.

Après 6 h d'éclairement des jeunes plants étiolés de Blé, nous avons noté :

- dans les proportions des formes de chlorophylles (fig. 22)
  - — un minimum de la forme II, moyennement liée ;
  - — un maximum de la forme III, très liée ;
- une augmentation fugace de la radioactivité spécifique de cette forme III suivie d'une stabilisation relative (tableau IX) ;
- un accident dans la courbe représentant la proportion de xanthophylles faciles à extraire (fig. 23).

Nous devons être conscients que la technique d'extraction ménagée a été mise au point sur des feuilles normalement vertes et qu'elle n'est peut-être pas transposable sans précaution à du matériel en voie de verdissement. Dans notre introduction, nous avons signalé l'hétérogénéité des chloroplastes d'une feuille verte ; lors des transformations des étioplastes en chloroplastes, l'hétérogénéité des organites doit être encore bien plus grande ; la vitesse des différentes opérations peut aussi varier au cours du temps d'éclairement. On imagine aisément que les forces de liaison des pigments aux lipoprotéines chloroplastiques en voie de remaniement complet varient profondément. Les centres de biosynthèse des chlorophylles, très actifs pendant le verdissement, peuvent ne pas être localisés de la même façon après quelques minutes et après plusieurs heures d'exposition à la lumière.

V. SIGNIFICATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ

On peut se demander si l'hétérogénéité des pigments chloroplastiques s'explique uniquement par des phénomènes physiques, par les diverses possibilités de liaisons aux structures protéiques et lipidiques, ou si elle a, en plus, une signification fonctionnelle, les pigments ainsi reconnus hétérogènes exerçant des fonctions différentes nécessaires à la vie de la plante. La réponse à cette question exige une longue poursuite du travail que nous venons d'exposer.

La technique que nous avons standardisée est une voie nouvelle d'approche de la description du chloroplaste à un niveau moléculaire par l'étude des relations des pigments avec leur environnement. Combinée aux méthodes isotopiques, elle permet de définir plusieurs fractions métaboliques d'un pigment donné et de

formuler quelques hypothèses sur leur signification. Quant aux rapports entre les formes des différents pigments liposolubles, on peut les supposer biosynthétiques ou fonctionnels.

A. TOPOLOGIE DU CHLOROPLASTE

Dans les reconstitutions des structures chloroplastiques tentées au cours des dernières années, la position exacte des molécules de chlorophylle est encore fortement discutée. Certains auteurs les placent dans les couches lipidiques dans lesquelles sont à demi-enfoncées les protéines globulaires (MÜHLETHALER, MOOR et SZARKOWSKI, 1965) ou bien au contact très étroit avec la trame protéique du chloroplaste (TOMAS, VAN LIEROP et TEN HAM, 1967, WEIER et BENSON, 1967). Nous sommes à ce niveau au-dessous du pouvoir de résolution des meilleurs microscopes électroniques, et la diffraction des rayons X renseigne seulement sur la densité électronique des diverses couches.

Notre technique d'emploi de solvants, donc d'introduction de molécules plus petites que les pigments dans les structures des chloroplastes apporte-t-elle quelques éclaircissements sur la construction d'une unité photosynthétique ? On ne « voit » rien sauf ce que l'on extrait, que l'on peut doser et dont on peut dresser un bilan. On peut étudier également ce qui reste en place après les traitements. On peut établir des relations entre les pigments extraits et les lipides qui les accompagnent. Avec la masse de β-carotène et les formes peu liées de chlorophylles et de xanthophylles, on extrait principalement une catégorie des lipides lamellaires des chloroplastes de Blé ; des résultats récents de notre laboratoire font apparaître que les monogalactosyldiglycérides de l'extrait éthéropétrolique possèdent des acides gras insaturés triéniques ; quand le nombre de molécules des composés contenus dans cet extrait sera complètement établi, nous pourrons tenter de reconstituer un modèle.

B. FRACTIONS MÉTABOLIQUES D'UN PIGMENT DONNÉ

1. **Définitions**

Un *compartiment* d'une substance A est l'ensemble d'unités de A (particules ou molécules) que l'on ne peut distinguer les unes des autres ni par leur nature, ni par leur localisation ; ces unités sont identiques, mélangées et interchangeables.

Une *fraction métabolique* (ou compartiment métabolique) d'une substance A est le groupe d'unités de A qui évoluent selon la même voie anabolique ou catabolique.

Il y a homogénéité quand un compartiment ne contient qu'une fraction métabolique, hétérogénéité dans tous les autres cas.

2. **Application aux pigments**

C'est en ce domaine que notre travail apporte le plus de renseignements nouveaux. Lors d'une extraction complète par l'acétone, on obtient un ensemble de molécules dont l'enrichissement isotopique est rendu homogène par mélange rapide. Si l'extraction est progressive, on peut décrire des compartiments d'après

les forces de liaison, définis par la polarité des solvants employés ou par les températures d'extraction ; de plus, la détermination des radioactivités spécifiques des compartiments ainsi isolés permet le regroupement ou la subdivision en fractions métaboliques. Nous venons de voir que chacun des caroténoïdes ou chacune des chlorophylles est constitué de *n* fractions métaboliques et que la concordance de ces fractions avec les compartiments n'est pas une règle. Nous ne pouvons déterminer *n* que par sa valeur minimum ;

- le β-*carotène* comprend *au moins* 2 *fractions métaboliques* ;
- on peut subdiviser en *au moins* 3 *fractions métaboliques* les ensembles des molécules de *chlorophylle a,* de *chlorophylle b,* de *lutéine* et de *violaxanthine.*

Le regroupement en fraction métabolique repose sur la similitude des radioactivités spécifiques mesurées pour certains groupes de molécules de pigments obtenus successivement par le même solvant employé à différentes températures ou bien par des mélanges de polarité croissant régulièrement.

La mesure des énergies de liaison des groupes de molécules isolées est moins avancée. Le contrôle de la température d'extraction du β-carotène des chloroplastes lyophilisés nous a permis d'appliquer la loi de VANT'HOFF et d'estimer une valeur de l'enthalpie molaire de liaison. Des essais à des températures beaucoup plus basses (−50 °C et au-dessous) pourraient faire apparaître une rupture de pente dans les droites du type de celles de la figure 15. Le cas du β-carotène, dans nos conditions expérimentales, est relativement simple ; quand il a quitté son site de liaison aux lipoprotéines chloroplastiques sous l'influence de l'éther de pétrole, il reste dans le solvant. On ne peut pas traiter sans précaution les autres pigments qui sont plus polaires à cause des phénomènes de réadsorption.

3. **Amélioration de la séparation des fractions métaboliques**

Nous avons étudié particulièrement la sélection des molécules les plus radioactives de chlorophylle *a* et de β-carotène.

L'ensemble de nos résultats sur les chlorophylles (tableau VIII) montre que plus le nombre de molécules extraites par le premier solvant de l'extraction ménagée est faible, plus grande est la chance de trouver que cette fraction contient les molécules les plus enrichies en isotopes (fig. 24). D'après l'étude sur modèles que nous avons tentée (DEROCHE, 1968), même en présence d'un grand nombre de fractions, nous trouvons toujours une augmentation du rapport de la radioactivité spécifique de la chlorophylle facile à extraire à la radioactivité spécifique du reste quand le nombre de molécules sélectionnées diminue.

Cette sélection est opérée par l'emploi *d'éther de pétrole seul* sur du matériel végétal lyophilisé. La proportion de chlorophylle ainsi extraite dépasse rarement 5 %, jamais 10 %, nous considérons comme des dilutions accidentelles les proportions plus importantes ; elles peuvent être dues à l'emploi de mélanges trop polaires, ou à l'entraînement mécanique de particules de feuilles lyophilisées finement broyées. *L'abaissement de la température d'extraction* permet aussi de mieux séparer les molécules de chlorophylle *a* les plus radioactives (tableau X).

Il y a aussi sélection des molécules de β-carotène les plus radioactives (fig. 15) ; elles se situent ici dans le compartiment des molécules les plus liées.

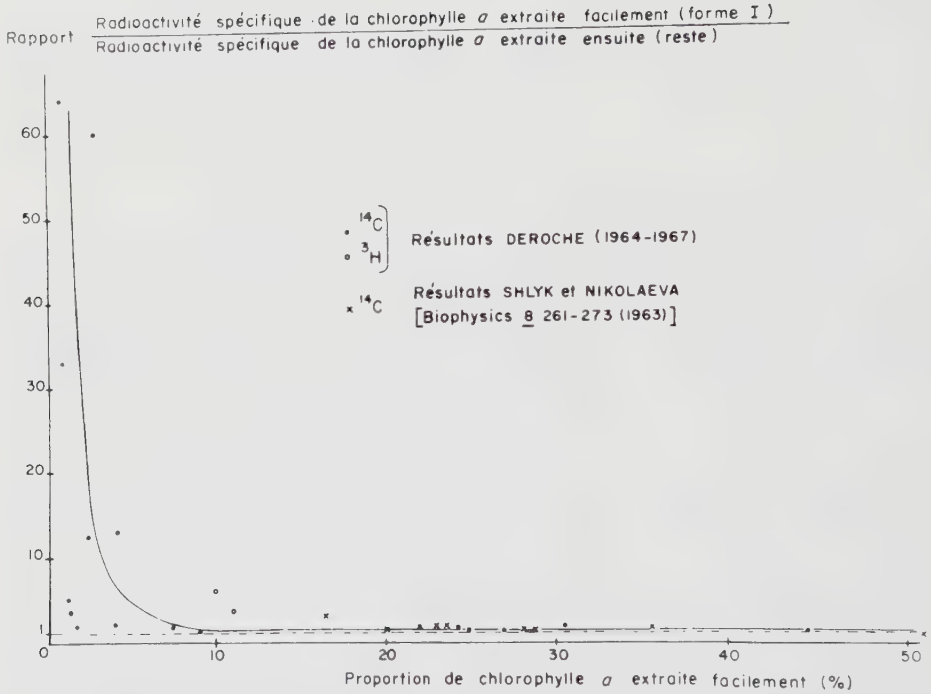


FIG. 24. — Relation entre la proportion de la chlorophylle *a* facile à extraire et l'importance de son enrichissement en traceur.

TABLEAU X

Amélioration de la sélection des molécules de chlorophylle a *par abaissement de la température d'extraction.*

Les solvants (ordre d'emploi indiqué de gauche à droite) ont traversé un mélange de sable et de chloroplastes cryodesséchés.

Solvant / Variétés	Ether de pétrole			Acétone	Acétone-eau (20 % d'eau)
	−10°	0°	20°		
Florence Aurore	19,7	16,3	16,0	9,3	3,0
Guelma		16,2	5,6	2,4	1,2

4. **Signification de l'existence de plusieurs fractions métaboliques d'un pigment donné**

La description détaillée de l'hétérogénéité pigmentaire nous amène à nous demander si elle a une signification fonctionnelle.

4.1. Les molécules les plus marquées sont néoformées

Les molécules les plus enrichies en isotopes radioactifs sont celles qui ont été synthétisées à une vitesse plus grande que les autres ; c'est pour cela qu'on les qualifie de néoformées. SHLYK et ses collaborateurs ont bien décrit les qualités de ces molécules de chlorophylles *a* dites « jeunes », situées dans des centres de biosynthèse liés aux petites particules qui sont séparables de la masse chloroplastique par centrifugation à 7 000 xg. Il manque, dans les divers articles russes, la preuve que ce sont bien les mêmes molécules que celles qui sont faciles à extraire par un solvant peu polaire : leur absence dans un extrait éthéropétrolique du culot n'est pas indiquée.

Nous avons confirmé l'enrichissement rapide en précurseurs de la chlorophylle *a* facile à extraire par marquage de feuilles vertes par le 4-^{14}C δ-aminolévulinate de potassium et par l'eau tritiée.

De plus, nos résultats expérimentaux sont en accord avec la lenteur du renouvellement de la chlorophylle dans les feuilles vertes ; les valeurs les plus élevées du rapport de la radioactivité spécifique de la chlorophylle *a* sélectionnée dans l'éther de pétrole à la radioactivité spécifique du reste des molécules de chlorophylle *a* (fig. 24) ont été trouvées pour des proportions de chlorophylle *a* dans l'éther de pétrole de 1 et 2 %. Les appréciations de la vitesse de renouvellement des atomes de carbone de la chlorophylle varient, selon les auteurs, d'une vitesse nulle dans les feuilles adultes de Blé (LARSON et PERKINS, 1961 ; PERKINS et ROBERTS, 1960 ; ROBERTS et PERKINS, 1962 ; VIRGIN, 1961) à un demi-renouvellement d'une durée de 3 à 4 jours chez de jeunes plants d'Avoine, d'Orge ou de Seigle, de 13 jours dans les feuilles adultes de Tabac (GODNEV et *al.*, 1957 ; SHLYK et *al.*, 1960). Si on estime qu'il faut 7 jours (15 h de lumière par jour × 7 = 105 h de lumière) pour renouveler le stock de chlorophylles d'une feuille de Blé, une heure de photosynthèse en présence de $^{14}CO_2$ permet la formation d'environ 1 % de molécules nouvelles. Donc la proportion de chlorophylle *a* la mieux sélectionnée par l'extraction éthéropétrolique semble bien correspondre aux molécules néoformées pendant une heure de photosynthèse.

Lors de nos essais avec des feuilles vertes de Blé âgées de 7, 10, 13 et 16 jours (tableau VIII) nous avons seulement vérifié l'hétérogénéité du marquage des chlorophylles dans les feuilles de différents niveaux.

Nous sommes en désaccord avec SHLYK au sujet de la proximité de la protochlorophyllide ou de la chlorophylllide et de la chlorophylle *a* néoformée ; nous n'en trouvons jamais dans les extraits éthéropétroliques qui contiennent les molécules de chlorophylle *a* les plus radioactives. Comme nous l'avons indiqué (chapitre IV), les chlorophyllides sont extraites avec la « forme III », très liée, des chlorophylles ; elles sont très abondantes au cours du verdissement. Ceci correspond bien avec la solubilité des chlorophyllides. Leur présence avec le compartiment III des chlorophylles pendant les temps d'exposition à la lumière des limbes étiolés est en accord avec la décroissance du pourcentage de cette forme entre 4 et 8 h (fig. 22) ; cette forme très liée aux structures semble alors nouvellement synthétisée à la vue de la distribution de la radioactivité après 6 h d'incorporation de δ-aminolévulinate de potassium ; mais les résultats obtenus après 4, 8 et 16 h de marquage redonnent à la chlorophylle facile à extraire (forme I) le caractère néoformé. La technique d'extraction ménagée qui superpose une hétérogénéité structurale à une hétérogénéité métabolique n'est peut-être pas applicable pour des étioplastes dans lesquels se produisent en même temps un réarrangement profond des structures et une biosynthèse accélérée des chlorophylles.

4.2. **L'hétérogénéité a-t-elle une signification fonctionnelle ?**

Seuls nos résultats montrant l'enrichissement en tritium du compartiment III très lié aux structures peuvent nous permettre de formuler l'hypothèse d'un rôle photosynthétique de cette forme. Sa localisation à proximité des protéines chloroplastiques, peut-être enzymatiques, est en accord avec cette hypothèse ; son squelette carboné semble peu perturbé alors que ses hydrogènes sont renouvelés rapidement.

Il faudrait revoir, à la lumière de ces résultats, le rôle de la chlorophylle comme *intermédiaire d'oxydo-réduction dans la photosynthèse*. L'enrichissement en isotopes de l'hydrogène de la masse chlorophyllienne est généralement considéré comme trop faible (VISHNIAC, 1960 ; BYRN, 1966), mais il s'agit non de l'ensemble des molécules mais d'une partie (environ 10 %), la question peut être reposée.

Nous n'avons pas fait d'expériences de fonctionnement des chloroplastes, tels que nous les avons traités, dans les réactions primaires de la photosynthèse. Il reste à rechercher si nos formes de chlorophylles ont une activité photochimique précise. La présence de chlorophylle *a* en grande quantité dans le premier mélange de l'extraction ménagée n'est pas un argument suffisant pour l'associer au système I de la photosynthèse comme le proposent SHLYK et SUKHOVER (1968), car la chlorophylle *a* est plus soluble que la chlorophylle *b* dans les solvants peu polaires.

Nous avons fait quelques essais de spectrophotométrie de différence (fig. 25) ; en comparant à des chloroplastes témoins cryodesséchés, des organites semblables auxquels l'éther de pétrole a enlevé 1 % de la chlorophylle, on observe la disparition d'une forme de chlorophylle absorbant à 668 nm, c'est-à-dire à une longueur d'onde plus faible que le maximum principal (675 nm).

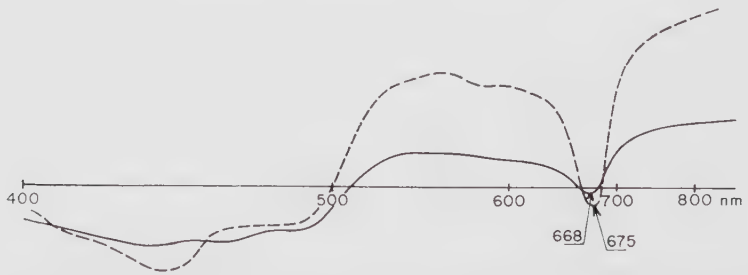


FIG. 25. — Différence de spectres obtenus entre une préparation chloroplastique témoin et :

— (———) une préparation chloroplastique lavée par l'éther de pétrole, ce qui lui a enlevé 1 % de sa chlorophylle totale,

— (— — —) une préparation chloroplastique lavée par l'éther de pétrole puis par les mélanges E.P.+éthanol (99,9 : 0,1)+(99,8 : 0,2)+(99,7 : 0,3)+(99,6+0,4), ayant perdu ainsi 48 % de sa chlorophylle totale. Les chloroplastes cryodesséchés sont étalés dans de l'huile de paraffine sur du papier pelure et maintenus entre deux lamelles de microscope. La préparation témoin est placée dans le faisceau de référence d'un spectrophotomètre Beckman DK 2A, la préparation partiellement extraite dans le faisceau de mesure.

Il reste encore la question du rôle des autres molécules de chlorophylles, peu impliquées dans le métabolisme ; leur proportion est la plus grande : 80 à 90 % du total. Comme toutes les molécules de pigments, elles absorbent des photons ;

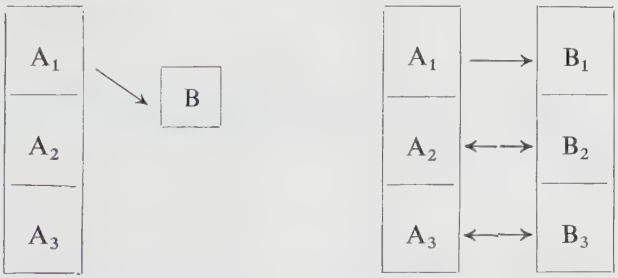
si les électrons expulsés n'aboutissent pas dans des « centres actifs » de la photosynthèse, l'énergie lumineuse captée peut être dégradée sous forme de chaleur ; si cette hypothèse est applicable à l'ensemble des molécules de la forme II, l'énergie transformée en chaleur pourrait être importante ; ainsi les molécules de chlorophylle contribueraient à élever la température des feuilles ou bien participeraient à la vaporisation de l'eau émise dans la transpiration. Dans le bilan énergétique de la production végétale, on peut estimer que le rayonnement solaire total arrivant au niveau d'une feuille se répartit en rayonnement transmis (20 %), réfléchi (10 %) et absorbé (70 %) ; 20 % du rayonnement étant réémis, 1 % est consacré à la photosynthèse et 49 % disponibles pour la transpiration (voir COSTES, 1960, 1964).

La forme II peut aussi constituer une réserve de molécules susceptibles de supporter des photodécolorations au moment d'un changement brutal d'intensité lumineuse dans les conditions naturelles, après le passage d'un nuage.

C. RAPPORTS ENTRE LES DIFFÉRENTES FRACTIONS MÉTABOLIQUES DES DIVERS PIGMENTS ÉTUDIÉS

On peut essayer de distinguer deux types de rapports :

1) **Au cours de la biosynthèse, une fraction déterminée donne naissance à un autre pigment ou à une partie de ce pigment**



SHLYK « franc champion de l'origine de la chlorophylle *b* dans la chlorophylle *a* » (BOGORAD, 1965) et ses collaborateurs estiment que ce sont *les molécules néoformées de chlorophylle a* qui *donnent* ainsi *la chlorophylle b* (GODNEV, ROTFARB et SHLYK, 1960 ; SHLYK et STANISHEVSKAYA, 1962 ; SHLYK et PRUDNIKOVA, 1967) ; malgré leurs précisions statistiques, les rapports des radioactivités spécifiques des chlorophylles *a* et *b* qu'ils fournissent sont souvent proches de 1.

D'après les sensibilités différentes à de fortes intensités lumineuses, MICHEL-WOLWERTZ (1963) propose aussi des relations entre les compartiments de nouvelles molécules de chlorophylle *a* et *b*. DURANTON (1966) calcule que la proportion de chlorophylle *a* néoformée qui donne de la chlorophylle *b* au cours du verdissement du Maïs est de 20 à 30 %. Dans la figure 26, le rapport des radioactivités spécifiques des différentes fractions de chlorophylles *a* et *b* arrachées par les mêmes solvants sont proches, dans la mesure où nous considérons que les valeurs

comprises entre 0,9 et 1,1 ne sont pas différentes de 1 ; généralement la radioactivité spécifique de la chlorophylle *a* est plus grande que celle de la chlorophylle *b* ; dans un seul cas, elle est 3 fois plus élevée.

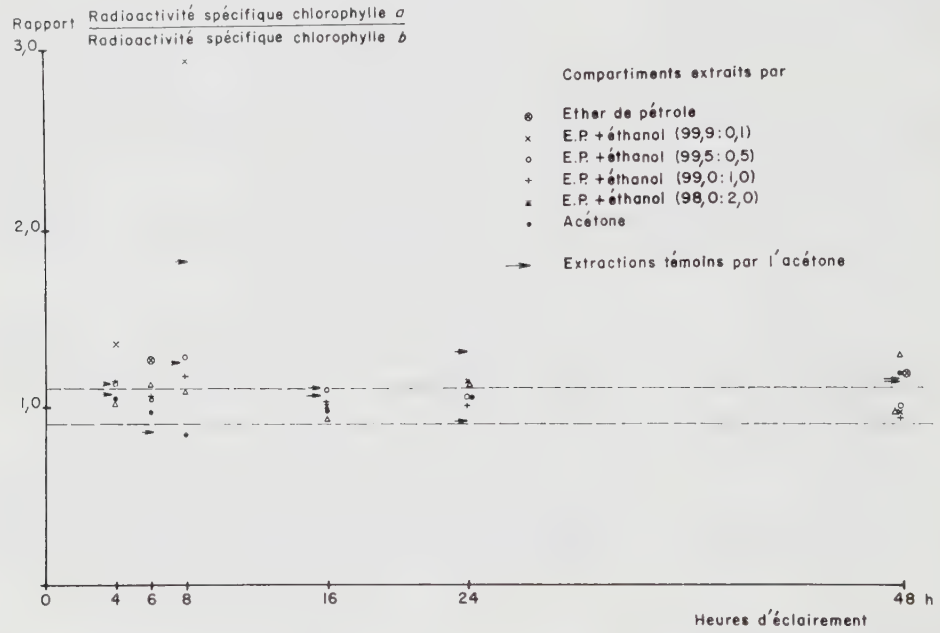


FIG. 26. — Comparaison entre les rapports des radioactivités spécifiques de la chlorophylle *a* et de la chlorophylle *b* obtenues par les divers mélanges extracteurs sur des feuilles en voie de verdissement. Les limbes étiolés ont été exposés à la lumière au temps 0 après 10 mn d'incorporation de ^{14}C δ-aminolévulinate de potassium ; ils sont lyophilisés après les durées d'éclairement indiquées.

Dans nos conditions expérimentales, on peut considérer que l'alimentation en précurseur a été continue ; en ce cas, la radioactivité spécifique d'un précurseur reste toujours supérieure à celle du dérivé. Il est évident que l'on peut écrire :

chlorophylle *a* ⟶ chlorophylle *b*

mais on peut tracer des flèches dans l'autre sens, quand les radioactivités spécifiques sont assez proches ou dans les quelques cas où une fraction métabolique de chlorophylle *b* est plus marquée que la fraction correspondante de chlorophylle *a* (fig. 26).

Il reste à prouver cette filiation des chlorophylles par incorporation de l'une et de l'autre. Les expériences de GODNEV *et al.* (1960) où de la ^{14}C-chlorophylle *a* en solution dans l'huile de Tournesol donne de la chlorophylle *b* marquée dans une feuille d'Oignon alors que la transformation de ^{14}C-chlorophylle *b* en chlorophylle *a* ne se produit pas, n'ont jamais été refaites à notre connaissance. Nos essais de mélange de ^{14}C-chlorophylle *a* avec de la chlorophylle *b* et de chlorophylle *a* avec

de la ^{14}C-chlorophylle *b* suivis de séparation chromatographique laissent apparaître la quasi-impossibilité de séparer d'une manière absolue les deux chlorophylles et leurs produits de dégradation. SHLYK et PRUDNIKOVA (1967) retrouvent encore des traces de pigments marqués mélangés après 11 chromatographies.

COSTES (1965) propose un schéma *d'interconversion des caroténoïdes* qui permet d'expliquer le marquage toujours plus important du β-carotène comparé à celui des xanthophylles. Nous avons souligné que certaines fractions de caroténoïdes hydroxylés, en particulier la violaxanthine, peuvent être précurseurs du β-carotène, d'après l'importance relative des radioactivités spécifiques (fig. 27).

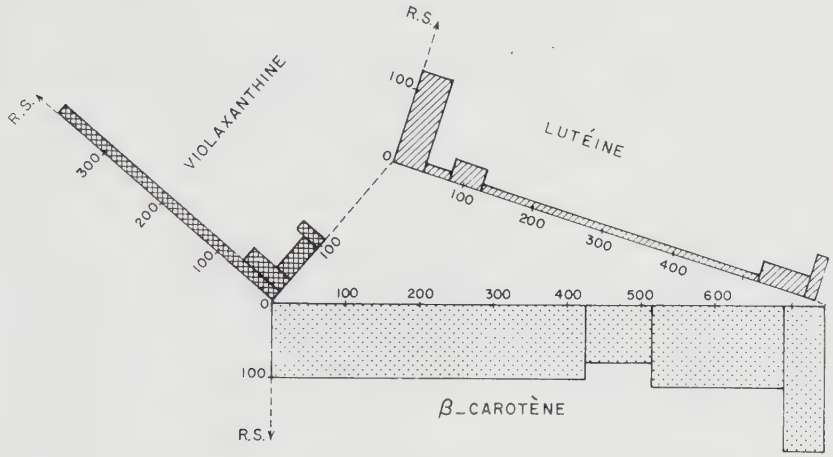


FIG. 27. — Comparaison entre les radioactivités spécifiques des fractions métaboliques de β-carotène, de lutéine et de violaxanthine extraits de feuilles fraîches.
Abscisses autour du triangle : nanomoles dans 10 g.
Ordonnées : R.S. = radioactivités spécifiques en impulsions par minute et par nanomole.

Si l'hétérogénéité métabolique des pigments est étendue à l'ensemble des constituants biochimiques, il sera peut-être nécessaire de revoir certaines chaînes de biosynthèse établies d'après l'enrichissement relatif en isotopes.

2) **Ces interconversions sont-elles fonctionnelles ?**

L'hétérogénéité est-elle une illustration biochimique de l'efficacité de la spécialisation du travail ? Non seulement il y a des substances aptes à capter l'énergie lumineuse mais une fraction de chacune d'entre elles pourrait jouer un rôle déterminé ; par exemple, certaines parties des xanthophylles joueraient un rôle dans l'évolution de l'oxygène, à travers la formation d'époxydes qui pourraient se dégrader ou retourner au β-carotène. De nombreux auteurs se préoccupent actuellement du rôle des caroténoïdes dans la photosynthèse (ADLER, 1967 ; DONOHUE, 1967 ; FORK et AMEZ, 1967 ; HAGER, 1967 ; LUNDEGARDH, 1967, 1968 ; SAPOZNIKOV et *al.*, 1967 ; YAMAMOTO, CHANG et AIHARA, 1967 ; COSTES, 1968 ; SAAKOV, 1968 ; TAKEGUCHI et YAMAMOTO, 1968). L'existence de fractions métaboliques pour chacun des pigments est en accord avec les fonctions multiples attribuées aux caroténoïdes.

Bien des questions ont été posées au cours de la présentation de ce travail ; certaines ont reçu une réponse ; d'autres servent de base à la poursuite de l'étude de la structure moléculaire des chloroplastes.

L'extraction ménagée telle que nous l'avons présentée devient une méthode nouvelle d'approche des relations des divers composants de l'organite photosynthétique. Nous l'avons appliquée aux chlorophylles et aux caroténoïdes et nous avons apporté de nombreux renseignements sur leur hétérogénéité structurale et métabolique.

La sélection des molécules « nouvelles » de pigments est désormais possible. Ces chlorophylles ou ces caroténoïdes néoformés représentent peut-être un excédent de la synthèse pigmentaire par rapport à celle des macromolécules des structures chloroplastiques ; la mise en place des complexes lipoprotéines-pigments subirait ainsi un retard. Il serait intéressant de savoir si les bactéries phototrophes (MOYSE, 1963) sont, sur ce point, mieux réglées que les végétaux supérieurs.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de la Station Centrale de Physiologie Végétale du Centre National de Recherches Agronomiques de Versailles.

Je remercie le jury de cette thèse, M.M A. MOYSE, Président, R. BOURDU, Rapporteur, J. LAVOREL et C. COSTES qui a suivi ces recherches avec attention.

Je remercie Mme Elisa CARRAYOL pour sa collaboration précieuse, et tous ceux qui, dans tous les domaines, m'ont aidée.

BIBLIOGRAPHIE

ADLER K., 1967. — Spezifische Rolle der Carotinoidabsorption bei der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung. *Planta,* **75,** 220-227.

ANDERSON J.M., BLASS U. et CALVIN M., 1960. — Biosynthesis and possible relations among the carotenoids and between chlorophyll *a* and *b*. In « *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems* », M.B. Allen, ed., Acad. Press, New York and London, 215-225.

ANDERSON A.F.H., CALVIN M., 1962. — An improved method for the separation and purification of chlorophyll *a*. *Nature,* **194,** 285-286.

ARNON D.I., 1949. — Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.,* **24,** 1-15.

ARNON D.I., ALLEN M.B. et WHATLEY R.F., 1956. — Photosynthesis by isolated chloroplasts. IV. General concept and comparison of three photochemical reactions. *Biochim. biophys. Acta.,* **20,** 449-461.

BACON M.F., 1966. — Artifacts from chromatography of chlorophylls. *Biochem. J.,* **101,** 34C-36C.

BISHOP N.I., 1958. — Vitamin K, an essential factor for the photochemical activity of isolated chloroplasts. *Proc. nat. Acad. Sci.,* **44,** 501-504.

BISHOP N.I., 1959. — The reactivity of a naturally occurring quinone (Q 255) in photochemical reactions of isolated chloroplasts. *Proc. nat. Acad. Sci.,* **45,** 1696-1702.

BLATZ P.E., 1965. — The role of carbonium ions in color reception. *J. gen. Physiol.,* **48,** 753-760.

BOGORAD L., 1965. — Chlorophyll biosynthesis. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments,* T.W. Goodwin éd., Academic Press, London and New York, 29-74.

BOTHOREL P. et LUSSAN C., 1968. — Sur un modèle de membrane biologique basé sur les interactions lipides-protéines. *C.R. Acad. Sci., ser. D,* **266,** 2492-2494.

BOURDU R., CHAMPIGNY M.L., LEFORT M., RÉMY R. et MOYSE A., 1965 *a.* — Structure et activité de l'appareil photosynthétique des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger, en fonction de leur croissance, de la carence et de la nutrition azotées. I. Croissance et activité photosynthétique des feuilles. *Physiol. Vég.,* **3,** 305-327.

BOURDU R., CHAMPIGNY M.L., LEFORT M., MASLOW M. et MOYSE A., 1965 *b.* — Structure et activité de l'appareil photosynthétique des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger, en fonction de leur croissance, de la carence et de la nutrition azotées. II. Structure, réaction de Hill et photophosphorylation cyclique des chloroplastes. *Physiol. Vég.,* **3,** 355-392.

BRIANTAIS J.M., 1968. — Isolement de structures liées aux deux systèmes photochimiques des chloroplastes. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.,* **14,** 227-244.

BYRN M., 1966. — The role of chlorophyll as a chemical intermediate in photosynthesis. *Ph. D. Thesis,* Univ. of California, Berkeley.

COSTES C., 1958. — Séparation et dosage des caroténoïdes foliaires par chromatographie sur cellulose. *Ann. Agron. Physiol. vég.,* suppl. **1,** 35-48.

COSTES C., 1960. — Absorption et utilisation de l'énergie lumineuse par les végétaux cultivés dans les conditions naturelles. *Ann. Physiol. vég.,* **3,** 175-229.

COSTES C., 1964. — Les exigences énergétiques de la production végétale. *Span,* **7,** 15-17.

COSTES C., 1965. — Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles. *Thèse, Doctorat d'Etat,* (Sc. Nat.) Paris-Orsay.

COSTES C., 1968. — Caroténoïdes et photosynthèse. Variations induites de la teneur en pigments dans les folioles excisées de Tomate. *Ann. Physiol. vég.,* **10,** 171-197.

COSTES C. et DEROCHE M.E., 1965. — Hétérogénéité des caroténoïdes dans les feuilles vertes, *C.R. Acad. Sci.,* **261,** 4893-4896.

DEROCHE M.E., 1967. — Extraction ménagée des chlorophylles à partir de chloroplastes lyophilisés. *Ann. Physiol. vég.,* **9,** 233-239.

DEROCHE M.E., 1968. — Sélection des molécules de chlorophylles *a* néoformées. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.,* **14,** 459-472.

DEROCHE M.E. et COSTES C., 1966 *a.* — Hétérogénéité des chlorophylles. Mise au point bibliographique. *Ann. Physiol. vég.,* **8,** 223-253.

DEROCHE M.E. et COSTES C., 1966 *b.* — Hétérogénéité du β-carotène dans les chloroplastes. *Ann. Physiol. vég.,* **8,** 259-269.

DEROCHE M.E. et COSTES C., 1968. — Heterogeneity of carotenoids in chloroplasts. In *Progress in Photosynthesis, International Congress of Photosynthesis Research Freudenstadt* (sous presse).

DEROCHE M.E. et DUFOUR P., 1968. — Etude de l'extinction de la scintillation due aux chlorophylles. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.* (sous presse).

DEROCHE-LABORIE M.E., COSTES C. et FERRON F., 1964. — Hétérogénéité structurale et métabolique des chlorophylles *a* et *b* dans les feuilles de Blé. *Ann. Physiol. vég.,* **6,** 187-209.

DONOHUE R.V., 1967. — The interconversion of the oxygenated carotenoids. *Diss. Abstr., Sect. B.,* **28,** 470 B - 471 B.

DUFOUR P., 1968. — Etude de quelques problèmes posés par la mesure des radioactivités spécifiques de pigments marqués au tritium. *Rapport de D.E.A. Physiol. vég.,* Orsay-Grignon.

DURANTON J., 1966. — Biosynthèse de la chlorophylle *b* au cours du verdissement de plantules de *Zea Mays. Physiol. vég.,* **4,** 75-88.

DURANTON J., GALMICHE J.M. et ROUX E., 1958. — Métabolisme des pigments chlorophylliens. *C.R. Acad. Sci.,* **246,** 992-995.

FERRON F., VAN ASSCHE J. et COSTES C., 1967. — Recherches sur les transformations de l'eau dans les feuilles avec l'eau tritiée. III. Circulation et échange de l'eau dans les jeunes plantes de deux variétés de Blé tendre. « *Florence Aurore* » et « *Guelma* » *Ann. Physiol. vég.,* **9,** 245-271.

FORK D.C. et AMESZ J., 1967. — Light-induced shifts in the absorption spectrum of carotenoids in red and brown algae. *Photochem. Photobiol.*, **6,** 913-918.

FRADKIN L.I., SHLYK A.A. et KOLYAGO V.M., 1966. — Biosynthèse de la chlorophylle *b* à l'obscurité par des plantes étiolées éclairées brièvement (en russe). *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.*, **171,** 222-225.

GAUDILLÈRE J.P., 1968. — Etude thermogravimétrique des chloroplastes lyophilisés. *Rapport de D.E.A. Physiologie végétale,* Orsay-Grignon.

GIBOR A., 1967. — Phenotypic variations among chloroplasts of a single cell. *Science,* **155,** 327-329.

GODNEV T.N., ROTFARB R.M. et SHLYK A.A., 1960. — Possibilité de transformation de la chlorophylle *a* en chlorophylle *b* au cours de la biosynthèse (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **130,** 663-666.

GODNEV T.N., TERENT'EVA M.V. et PARMON K.P., 1950. — Comparative energy of extraction of chlorophyll of various plants by inactive solvents. *Akad. Nauk Belorus S.S.R., Inst. Biol., Sbornik Nauch Trudov,* n° 1, 3-7 in *C.A.*, **50,** 14 885 b (1956).

GODNEV T.N., TURCHIN F.V. et SHLYK A.A., 1957. — On the renewal of chlorophyll and proteins in plants. *Intern. Conf. on Radioisotopes in Sci. Res.,* UNESCO, Paris, **4,** 471-478.

GURINOVICH G.P. et STRELKOVA T.I., 1968. — Mécanisme d'association de la chlorophylle et de ses analogues (en russe). *Biofizika,* **13,** 782-792.

HAGER A., 1967. — Studies on the light-induced reversible xanthophyll-conversions in *Chlorella* and spinach leaves. *Planta.*, **74,** 148-172.

HOLDEN M., 1965. Chlorophylls. In *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.* T.W. Goodwin, éd., Acad. Press., New York and London, 462-488.

ICHIKAWA M., TSUTSUI M. et VOHWINKEL F., 1967. — Iron carbonyl complexes of β-carotene and lycopene. *Z. Naturforsch.*, **22,** 376-379.

JI T.H., HESS J.L. et BENSON A.A., 1968. — Studies on chloroplast membrane structure. I. Association of pigments with chloroplast lamellar protein. *Biochem. Biophys. Acta,* **150,** 676-685.

JI T.H. et BENSON A.A., 1968. — Association of lipids and proteins in chloroplast lamellar structure. *Biochem. Biophys. Acta.*, **150,** 686-693.

KATZ J.J. and BALLSCHMITER K., 1968. — Chlorophyll-water interaction. *Angew. Chemie, Inter. Ed.*, **7,** 286-287.

KE B., 1966. — Some properties of chlorophyll monolayers and crystalline chlorophyll. In *The chlorophylls,* L.P. Vernon et G.R. Seely, éd. Acad. Press, New York and London, 253-279.

KIRK J.T.O. and TILNEY-BASSETT R.A.E., 1967. — *The Plastids.* Freeman and Company, London and San Francisco.

KLEIN A.O. and VISHNIAC W., 1961. — Activity and partial purification of chlorophyllase in aqueous systems. *J. biol. Chem.*, **236,** 2544-2547.

KREUTZ W., 1968 *a.* — On the state of chlorophyll *in vivo. Z. Naturforsch.*, **23** b, 520-527.

KREUTZ W., 1968 *b.* — On the architecture of the photosynthetic apparatus. *Bull. Soc. franç. Physiol. vég.*, **14,** 175-193.

LABORIE M.E., 1963. — Contribution à l'étude des actions de la gibbérelline et du chlorure de chlorocholine sur le métabolisme des pigments foliaires. II. Actions de la gibbérelline et du C.C.C. sur les teneurs et sur les vitesses de renouvellement des pigments chloroplastiques. *Ann. Physiol. vég.*, **5,** 89-113.

LARSON R.I. et PERKINS H.J., 1961. — Photosynthesis in a line of wheat nullisomic for chromosome 3D (XVI). *Can. J. gen. Cytol.*, **3,** 396-402.

LUNDEGÅRDH H., 1967. — Role of carotenoids in photosynthesis of green plants. *Nature,* **216,** 981-985.

LUNDEGÅRDH H., 1968. — The systems I, II and III in the photosynthetic cycle of electron transfer. *Physiol. Plantarum.*, **21,** 148-167.

LYNCH V.H. and FRENCH C.S., 1957. — β-carotene, an active component of chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **70,** 382-391.

MAC KINNEY G., 1941. — Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. biol. Chem.*, **140,** 315-322.

MAGREE L., HENNINGER M.D. et CRANE F.L., 1966. — Electron transport in chloroplasts. II. Effect of hydrocarbon solvent extraction on chloroplast membrane structure. *J. biol. Chem.*, **241,** 5197-5200.

MENKE W., 1966. — The structure of the chloroplasts. In *Biochemistry of Chloroplasts,* T.W. Goodwin éd., Acad. Press, New York and London, 4-18.

MICHEL-WOLWERTZ M.R., 1963. — Photo-oxidation of chlorophyll pigments in the presence of a radioactive precursor. *Photochem. Photobiol.*, **2,** 149-158.

MOYSE A., 1963. — La photosynthèse bactérienne. Le rôle des substances réductrices. In *Problèmes du métabolisme respiratoire et d'oxydations cellulaires.* (Exposés actuels de Biologie cellulaire), Masson éd. Paris, 149-203.

MÜHLETHALER K., MOOR H. and SZARKOWSKI J.W., 1965. — The ultrastructure of the chloroplast lamellae. *Planta,* **67,** 305-323.

NEMETHY G., 1967. — Hydrophobic interactions. *Angew. Chemie. Intern. Ed.,* **6,** 195-206.

PARK R.B., 1966. — Chloroplast structure. In *The Chlorophylls.* L.P. Vernon et G.R. Seely éd., Acad. Press, New York and London, 283-311.

PARK R.B. and PON N.G., 1963. — Chemical composition and the substructure of lamellae isolated from *Spinacea oleracea* chloroplasts. *J. mol. Biol.,* **6,** 105-114.

PERKINS H.J. et ROBERTS D.W.A., 1960. — Chlorophyll biosynthesis in wheat leaves. *Biochem. Biophys. Acta.,* **45,** 613-614.

RÉMY R. et CHAMPIGNY M.L., 1966. — Structure et activité de l'appareil photosynthétique des feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger, en fonction de leur croissance, de la carence et de la nutrition azotées. III. Composition des chloroplastes et répartition des produits photosynthétisés. *Physiol. Vég.,* **4,** 237-261.

ROBERTS D.W.A. et PERKINS H.J., 1962. — Chlorophyll biosynthesis and turnover in wheat leaves. *Biochem. biophys. Acta.,* **58,** 499-506.

RUMBERG B. und WITT H.T., 1964. — Analyse der Photosynthese mit Blitzlicht. I. Die Photooxydation von Chlorophyll *a,* 430-703. *Z. Naturforsch,* **19 b,** 693-707.

SAAKOV V.S., 1968. — Oxidation metabolism of carotene and the physiological role it plays in the leaf (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.,* **180,** 241-244.

SAPOZNIKOV D.I. et CHERNOMORSKY S.A., 1960. — Sur la possibilité d'extraction de la chlorophylle des feuilles par un mélange de solvants polaires et non polaires (en russe). *Fiziol. Rasten.,* **7,** 660-664.

SAPOZNIKOV D.I., KATYURIN V.M., MASLOVA T.G., ULUBEKOVA M.V., NAZAROV N.M., ARTAMKINA I.Y. et SEMENYUK K.G., 1967. — Oxygen exchange of xanthophylls as related to their role in the process of plant photosynthesis (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.,* **175,** 1182-1185.

SAPOZNIKOV D.I., MASLOVA T.G., BAJANOVA I.V., POPOVA O.F., CHERNOMORSKY S.A. et SHIJAEVA G.A., 1962. — Etat des pigments dans les feuilles (en russe). *Trud. Botan. Inst. V.L. Komarova, Akad. Nauk S.S.S.R.,* ser., **4,** 53-67.

SEELY G.R., 1966. — The structure and chemistry of functional groups. In *The Chlorophylls,* L.P. Vernon et G.R. Seely éd., Acad. Press., New York and London, 67-109.

SHLYK A.A., 1961. — Investigations of biosynthesis kinetics of chlorophyll *b* in green plants by radioisotopes (en russe). *Tr. Tasshkentst. Konf. po Mirnomu Ispol'z. At. Energii, Akad. Nauk Uz. S.S.R.,* **3,** 161-166.

SHLYK A.A. et BALEVA E.F., 1965. — Grande fragilité des jeunes molécules de chlorophylle sous l'action des ultrasons (en russe). *Biofizika,* **10,** 578-585.

SHLYK A.A., BARANOV A.A., MAKHJUK M.D. et RUSAK E.N., 1967. — Phéophytinisation sélective des nouvelles molécules de chlorophylles dans les cellules d'Euglènes (en russe). *Biokhimija,* **32,** 50-58.

SHLYK A.A. et FRADKIN L.I., 1961. — Analyse par la cinétique isotopique de la possibilité de biosynthèse successive des chlorophylles *a* et *b* (en russe). *Biofizika,* **6,** 424-435.

SHLYK A.A. et FRADKIN L.I., 1962. — Sur la vitesse du métabolisme de la chlorophylle chez les plantes vertes (en russe). *Biofizika*, **7**, 281-291.

SHLYK A.A., FRADKIN L.I., CHKANIKOVA R.A. et SUKHOVER L.K., 1966. — Fractionnement des pigments d'un homogénat de feuilles vertes (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **167**, 706-709.

SHLYK A.A., FRADKIN L.I., PRUDNIKOVA I.V. et SAVCHENKO G.E., 1967. — Reaction centers of chlorophyll metabolism. *Abstracts VIIth Inter. Biochem. Congress, Tokyo.* H 97 p. 905.

SHLYK A.A., GAPONENKO V.I., PRUDNIKOVA I.V., KUKHTENKO T.V. et LYAKOVICH Y.P., 1960. — Etude comparative du renouvellement de la chlorophylle dans les différentes parties de la plante (en russe). *Fiziol. Rasten.*, **7**, 625-637.

SHLYK A.A., LJAKHNOVICH Ja.P., KALER V.L. et LIPSKAYA G.A., 1957. — Differentiation of the chlorophyll molecule in its destruction in aging plants (en biélorusse). *Byull. Inst. Biol. Akad. Nauk Belorus. S.S.R.*, 1957, n° 3, 111-114. In *C.A.*, **55**, 12553 d (1961).

SHLYK A.A. et MIKHAILOVA S.A., 1967. — Formes lipophile et hydrophile de chlorophylle *a* et *b* et particularités de leur métabolisme dans une culture synchrone de Chlorelles (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **177**, 236-239.

SHLYK A.A. et NIKOLAEVA G.N., 1962. — Hétérogénéité de la chlorophylle dans les plantes (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **143**, 460-463.

SHLYK A.A. et NIKOLAEVA G.N., 1963 *a*. — The demonstration of the heterogeneity of chlorophylls *in vivo*. In *La Photosynthèse, Publ. C.N.R.S., Paris.* n° **119**, 301-314.

SHLYK A.A. et NIKOLAEVA G.N., 1963 *b*. — Metabolic manifestation of the heterogeneity of chlorophyll in green plants. *Biophysics, U.R.S.S.*, **8**, 261-273.

SHLYK A.A. et PRUDNIKOVA I.V., 1958. — Particularités de la cinétique d'extraction de la chlorophylle des feuilles par des solvants non polaires (en biélorusse). *Vesci Akad. Navuk Belorus. S.S.R., ser. bijal. Navuk*, **3**, 16-21.

SHLYK A.A. et PRUDNIKOVA I.V., 1961. — Relation entre l'hétérogénéité métabolique et physico-chimique de la chlorophylle (en russe). *Vesci Akad. Navuk Belorus. S.S.R., ser. bijal. Navuk*, **4**, 129-131.

SHLYK A.A. et PRUDNIKOVA I.V., 1967. — Dark biosynthesis of chlorophyll *b* by fractions of barley chloroplasts. *Photosynthetica*, **1**, 157-170.

SHLYK A.A., PRUDNIKOVA I.V., FRADKIN L.I, NIKOLAEVA G.N. et SAVCHENKO G.E., 1968. Relationship between chlorophyll metabolism and heterogeneity of pigment apparatus. In *Progress in Photosynthesis, International Congress of Photosynthesis Research*, Freudenstadt (in press).

SHLYK A.A. et SAVCHENKO G.E., 1967. — Fractionnement des particules portant la protochlorophylle dans les chloroplastes de feuilles vertes d'Orge (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **176**, 1437-1440.

SHLYK A.A. et STANISHEVSKAYA E.M., 1962. — Biosynthèse de la chlorophylle *b* à l'obscurité (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **144**, 226-229.

SHLYK A.A. et SUKHOVER L.K., 1968. — Fractionnement des formes pigmentaires métaboliquement hétérogènes chez les Euglènes (en russe). *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.*, **181**, 1274-1277.

SHLYK A.A., VLASENOK L.I., CHKANIKOVA R.A., FRADKIN L.I., MIKHAILOVA S.A., SAVCHENKO G.E. et SUKHOVER L.K., 1967. — Conception of reaction centers of chlorophyll metabolism. *Studia biophysica*, **5**, 17-24.

SIRONVAL C. et KANDLER O., 1958. — Photooxidation processes in normal green *Chlorella* cells. I. The bleaching process. *Biochem. Biophys. Acta.*, **29**, 359-368.

SIRONVAL C., VERLY W.G. et MARCELLE R., 1961. — Radioisotopic study of chlorophyll accumulation in soybean leaves, in the conditions of a transfer from one day-lenght to another (« transfer-effect »). *Physiol. Plantarum*, **14**, 303-309.

SISLER E.C. and KLEIN W.H., 1963. — The effect of age and various chemicals on the lag phase of chlorophyll synthesis in dark-grown bean seedlings. *Physiol. Plantarum*, **16**, 315-322.

STRAIN H.H., SHERMA J. et GRANFOLDO M., 1967. — Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsobents. *Anal. Chem.*, **39,** 926-932.

SUBBARAYAN C., JUNGALWALA F.B. et CAMA H.R., 1965. — Applicability of partition ratios, mercuric chloride complexes and chromatographic behavior for the identification of carotenoids. *Anal. Biochem.*, **12,** 275-281.

TAKEGUCHI C.A. et YAMAMOTO H.Y., 1968. — Light-induced $^{18}O_2$ uptake by epoxyxanthophylls in New Zealand spinach leaves. *Biochem. biophys. Acta.*, **153,** 459-465.

THOMAS J.B., VAN LIEROP J.H. et TEN HAM M., 1967. — Dichroism in spinach chloroplasts. *Biochem. biophys. Acta.*, **143,** 204-220.

TOLBERT N.E. et GAILEY F.B., 1955. — Carbon dioxide fixation by etiolated plants after exposure to white light. *Plant Physiol.*, **30,** 491-499.

VAN NORMAN R.W., 1957. — Errors in spectrophotometric analysis of chlorophyll mixtures. *Utah Acad. Sci. Proc.*, **34,** 39-44.

VARTAPETIAN B.B., 1960. — Un appareil de laboratoire simplifié pour dessécher du matériel biologique par cryodessiccation. *Fiziol. Rasteni.*, **7,** 740-741.

VIRGIN H.J., 1961. — On the formation of protochlorophyll in normal green wheat leaves of varing age. *Physiol. Plantarum*, **14,** 384-392.

VISHNIAC W., 1960. — Chemical participation of chlorophyll in photosynthesis. In *Comparative biochemistry of photoreactive systems.* M.B. Allen éd., Acad. Press, New York and London, 377-386.

WEIER T.E. and BENSON A.A., 1967. — The molecular organization of chloroplast membranes. *Amer. J. Bot.*, **54,** 389-402.

YAMAMOTO H.Y., CHANG J.L. et AIHARA M.S., 1967. — Light-induced interconversion of violaxanthin and zeaxanthin in New Zealand spinach leaf segments. *Biochem. biophys. Acta.*, **141,** 342-347.

ZINSOU C., 1968. — Amélioration d'un dispositif d'extraction différentielle permettant l'étude des chloroplastes lyophilisés. *Rapport de D.E.A. Physiologie végétale appliquée,* Paris.